

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Papel da Glicoproteína G do vírus da Raiva na Indução de Apoptose

Tiago Miguel Baeta Luís

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Miguel Fevereiro
Professora Doutora Maria Filomena Caeiro

2019



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, sob a coorientação directa do Professor Doutor Miguel Fevereiro e da Doutora Isabel Almeida.

A Professora Doutora Maria Filomena Caeiro foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Esta dissertação foi redigida em Português anterior ao Acordo Ortográfico em vigor.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio, colaboração e dedicação de várias pessoas a quem deixo aqui os meus humildes agradecimentos.

Aos meus orientadores externos Doutora Isabel Almeida e Professor Doutor Miguel Fevereiro pela constante disponibilidade e tão rico e completo conhecimento que me foram transmitindo ao longo destes anos.

À minha orientadora interna Professora Doutora Maria Filomena Caeiro pela total disponibilidade e entrega na orientação deste trabalho.

A todo o pessoal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, principalmente a todas as pessoas do Laboratório de Virologia que me acolheram tão bem desde o primeiro dia e das quais eu já sinto como sendo uma extensão da minha família.

Um particular agradecimento à Doutora Margarida “Coronela” Henriques Mourão por todo o apoio e disponibilidade demonstrados.

À minha Mãe e mano, por tudo e mais alguma coisa.

À Maria João, pelo carinho e paciência.

À restante Família e amigos.

Resumo

A Raiva é uma zoonose causada por um vírus neurotrópico pertencente ao género *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*. Este vírus infecta todas as espécies de animais de sangue quente.

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a influência da glicoproteína G do vírus da raiva na replicação em células de neuroblastoma murino Neuro2a cultivadas *in vitro*, assim como na indução da apoptose. Foram comparados dois genótipos distintos, genótipo 1 (CVS-11, estirpe fixa, atenuada *in vitro* por passagens seriadas em culturas celulares BHK-21, e CVS-27, estirpe fixa, atenuada *in vivo* por passagens seriadas em cérebro de ratinho lactante) e genótipo 5 (EBLV-1, estirpe selvagem de quirópteros isolada em células de neuroblastoma). A cinética de replicação dos vírus em estudo foi avaliada por transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR), e expressão das proteínas N (precoce) e G (tardia) por imunofluorescência. A apoptose foi avaliada através da visualização em gel das alterações do DNA celular sujeito a electroforese.

Foram encontradas diferenças significativas na expressão das proteínas N e G, quer entre as duas estirpes fixas estudadas, quer entre as estirpes fixas e a estirpe isolada a partir de morcegos. A expressão de proteína N mostrou-se mais precoce em CVS-27 que em CVS-11, sugerindo que o ciclo replicativo da primeira estirpe seja mais curto que o da última. A expressão de G foi observada mais tardiamente, estando em conformidade com o facto de que a sua expressão só ocorre no final do ciclo replicativo. A expressão das proteínas N e G de EBLV-1 foi observada apenas às 24 h p.i., com fraca intensidade de fluorescência e com um número mais reduzido de células infectadas, o que evidencia uma evolução de infecção mais lenta e gradual desta estirpe na linha celular utilizada neste trabalho quando comparada com as estirpes fixas. No seu todo, estes resultados sugerem que a duração do ciclo replicativo depende da susceptibilidade e permissibilidade do sistema celular à infecção pelas diferentes estirpes de vírus da raiva.

Os ensaios de apoptose induzida pela infecção destes Lyssavírus, embora preliminares, sugerem que a estirpe EBLV-1 seja a mais apoptótica das estirpes estudadas.

Palavras chave: vírus da raiva; RABV; glicoproteína G; nucleoproteína N; CVS-11; CVS-27; Genótipo 1; EBLV-1; Genótipo 5; apoptose.

Abstract

Rabies is a zoonosis caused by a neurotropic virus belonging to the genus *Lyssavirus*, family *Rhabdoviridae*, order *Mononegavirales*. This virus infects all species of warm-blooded animals.

This study aimed to evaluate the influence of rabies virus glycoprotein G on the viral replication in *in vitro* cultured murine neuroblastoma cells, as well as on the induction of apoptosis. Two distinct genotypes were compared, genotype 1 (CVS-11, fixed strain, attenuated by serial passages in BHK-21 cell cultures, and CVS-27, fixed strain, attenuated *in vivo* by serial passages in lactating mouse brain) and genotype 5 (EBLV-1, wild chiropteran strain isolated on neuroblastoma cells). The replication kinetics of the studied viruses were evaluated by reverse transcription followed by quantitative PCR (RT-qPCR), and expression of N (early) and G (late) proteins by immunofluorescence. Apoptosis was assessed by gel visualization of cell DNA changes.

Significant differences were found in the expression of N and G proteins, both between the two fixed strains studied and between the fixed strains and the strain isolated from bats. Protein N expression was earlier in CVS-27 than in CVS-11, suggesting that the replicative cycle of the first strain is shorter than the last. G expression was observed later, in line with the fact that its expression only occurs at the end of the replicative cycle. The expression of EBLV-1 N and G proteins was observed only at 24 h pi, with low fluorescence intensity and with a smaller number of infected cells, which shows a slower and more gradual evolution of this strain in the cell line used in this work when compared to fixed strains. Overall, these results suggest that the duration of the replicative cycle depends on the susceptibility and permissibility of the cellular system to infection by different strains of rabies virus.

Apoptosis assays induced by infection of these Lyssaviruses, although preliminary, suggest that the EBLV-1 strain is the most apoptotic of the studied strains.

Key words: Rabies virus; RABV; G glicoprotein; N nucleoprotein; CVS-11; CVS-27; Genotype 1; EBLV-1; Genotype 5; apoptosis.

Lista de tabelas

Tabela 1 - <i>Primers</i> e sondas utilizados para RT-PCR e RT-qPCR	16
Tabela 2 - Condições de amplificação parcial dos genes N e G por RT-PCR	16
Tabela 3 - Condições para as reacções de RT-qPCR	17
Tabela 4 - Reagentes constituintes da mistura de ligação	17
Tabela 5 - Componentes das reacções de ligação	18
Tabela 6 - Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência em células Neuro2a, 12 h p.i.	22
Tabela 7 - Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência em células Neuro2a, 18 h p.i.	22
Tabela 8 - Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência em células Neuro2a, 24 h p.i.	22
Tabela 9 - Concentração e número de cópias de RNA das amostras em estudo	24
Tabela 10 - Número de cópias em cada diluição utilizada para a construção das rectas de calibração	24
Tabela 11 - Cálculo de E e R ² relativos à recta de calibração para o o gene G das estirpes fixas de CVS	25
Tabela 12 - Cálculo de E e R ² relativos à recta de calibração para o o gene G da estirpe EBLV-1	26
Tabela 13 - Cálculo de E e R ² relativos à recta de calibração para o o gene N das estirpes fixas de CVS	27
Tabela 14 - Cálculo de E e R ² relativos à recta de calibração para o o gene N da estirpe EBLV-1	27
Tabela 15 - Número de cópias de RNA relativo a cada valor de Ct obtido nas reacções de RT-qPCR para a glicoproteína G	29
Tabela 16 - Número de cópias de RNA relativo a cada valor de Ct obtido nas reacções de RT-qPCR para a glicoproteína N	31

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura do viri3o caracter3stico da fam3lia Rhabdoviridae. <i>Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics</i>	6
Figura 2 - Organiza3o gen3mica caracter3stica de um Lyssav3rus. <i>Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics</i>	6
Figura 3 - Ciclo replicativo de um Rhabdov3rus [Flint et al., 2015]	8
Figura 4 - Imagens de microscopia de fluoresc3ncia para detec3o das prote3nas N e G das estirpes em estudo.	23
Figura 5 - Gr3fico de amplifica3o e respectiva curva de calibra3o para o gene G das estirpes fixas de CVS	25
Figura 6 - Gr3fico de amplifica3o e respectiva curva de calibra3o para o gene G da estirpe EBLV-1	25
Figura 7 - Gr3fico de amplifica3o e respectiva curva de calibra3o para o gene N das estirpes fixas de CVS	26
Figura 8 - Gr3fico de amplifica3o e respectiva curva de calibra3o para o gene N da estirpe EBLV-1	27
Figura 9 - Curvas de amplifica3o do gene G para cada uma das estirpes estudadas	28
Figura 10 - Curvas de amplifica3o do gene N para cada uma das estirpes estudadas	29
Figura 11 - Cin3tica de transcri3o do gene G para as estirpes em estudo	30
Figura 12 - Cin3tica de transcri3o do gene N para as estirpes em estudo	32
Figura 13 - Visualiza3o do padr3o de migra3o em electroforese do DNA extra3do de culturas de c3lulas Neuro2a a diferentes tempos ap3s infec3o.	32
Figura 14 - Visualiza3o do padr3o de migra3o em electroforese do DNA extra3do de culturas de c3lulas Neuro2a 3s 48h e 72h ap3s infec3o. Efeito de escada, t3pico de apoptose marcado pelo rect3ngulo a tracejado.	33

Lista de Abreviaturas

RABV - vírus da Raiva	N - Nucleoproteína
SNC - Sistema Nervoso Central	L - Polimerase
SNP - Sistema Nervoso Periférico	P - Fosfoproteína
FAT - <i>Fluorecent Antibody Test</i>	M - Proteína transmembranária da matriz
RTCIT - <i>Rabies Tissue Culture Infection Test</i>	CVS - <i>Challenge Virus Standard</i>
RT-PCR - <i>Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction</i>	ERA - <i>Evelyn gaynor, Roktinicki, Abelseth</i>
N - Nucleoproteína N	HEP - <i>High Egg Passage</i>
G - Glicoproteína G	SAD B19 - <i>Street Alabama Dufferin</i>
LBV - <i>Lagos Bat Virus</i>	Gln - Glicina
MOKV - <i>Mokola Virus</i>	Arg - Arginina
DUVV - <i>Duvenhage Virus</i>	BHK21 - <i>Baby Hamster Kidney</i>
EBLV-1 - <i>European Bat Lyssavirus type-1</i>	MEM - <i>Modified Eagle's Medium</i>
EBLV-2 - <i>European Bat Lyssavirus type-2</i>	FBS - <i>Fetal Bovine Serum</i>
ABLV - <i>Australian Bat Lyssavirus</i>	m.o.i. - multiplicidade de infecção
ARAV - <i>Aravan Virus</i>	PBS - <i>Phosphate Buffered Saline</i>
KHUV - <i>Khujand Virus</i>	FITC - <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
IRKV - <i>Irkut Virus</i>	IFD - Imunofluorescência Directa
WCBV - <i>West Caucasian Bat Virus</i>	IFI - Imunofluorescência Indirecta
NCAM - <i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>	NCBI - <i>National Center for Biotechnology Information</i>
RNP - Ribonucleoproteína	BLAST - <i>Basic Local Alignment Tool</i>
RNA - <i>Ribonucleic Acid</i>	SOC - <i>Super Optimal Broth</i>
	STET - Sucrose Triton EDTA Tris

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de tabelas	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Índice	ix
1. Introdução	1
1.1. Perspectiva Histórica	2
1.2. Patogenia	2
1.3. Taxonomia	3
1.4. Quadro Clínico	4
1.5. Diagnóstico	4
1.6. Propriedades dos <i>Rhabdovirus</i>	5
1.6.1. Classificação	5
1.6.2. Propriedades do virião	6
1.6.3. Ciclo replicativo	7
1.7. Relação entre a expressão da Glicoproteína G do RABV, apoptose e patogenicidade	8
2. Materiais e Métodos	12
2.1. Estirpes de vírus da Raiva	12
2.2. Culturas Celulares	12
2.3. Inoculação de culturas celulares com o vírus da Raiva	12
2.4. Titulação de vírus em FID50 (<i>Fluorescent Infectious Dose 50</i>)	13
2.5. Cinéticas de Expressão de Proteínas do Vírus da Raiva	14
2.6. Imunofluorescência Directa (IFD) para detecção do antígeno nucleocápside	14
2.7. Imunofluorescência Indirecta (IFI) para detecção do antígeno glicoproteína	14
2.8. Cinética de Replicação do Vírus da Raiva	15

2.8.1. Extracção de Ácidos Nucleicos	15
2.8.2. Amplificação parcial dos genes N e G por RT-PCR e RT-qPCR	15
2.8.3. Clonagem	17
2.8.4. Transcrição <i>in vitro</i>	18
2.8.5. Curvas de Calibração	19
2.9. Avaliação da apoptose: Visualização do padrão de migração do DNA por electroforese em gel de agarose	19
3. Análise e Discussão de Resultados	20
3.1. Cinéticas de Expressão de Proteínas do Vírus da Raiva	20
3.1.2. Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência	20
3.1.3. Rectas de Calibração	24
3.1.4. RT-qPCR do gene G das estirpes fixas de CVS	25
3.1.5. RT-qPCR do gene G da estirpe EBLV-1	25
3.1.6. RT-qPCR do gene N das estirpes fixas de CVS	26
3.1.7. RT-qPCR do gene N da estirpe EBLV-1	27
3.2. Apoptose	32
4. Conclusões e Perspectivas Futuras	34
5. Referências Bibliográficas	35

1. Introdução

A Raiva é uma zoonose causada por um vírus neurotrópico pertencente ao género *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*.

Ao contrário da maioria dos vírus, o vírus da Raiva (*Rabies Virus* - RABV) infecta um variado espectro de hospedeiros, o que se explica pelo facto de o vírus utilizar como porta de entrada o músculo estriado e a adsorção, fase inicial da interacção vírus-célula, ocorrer por ligação da Glicoproteína G viral e um receptor ubiquitário presente nas junções neuromusculares - o receptor nicotínico da acetilcolina nAChR. Tão vasto espectro de hospedeiros justifica a distinção entre 4 ciclos biológicos - Raiva de rua, que afecta os animais de companhia; Raiva de animais domésticos de grande porte, que atinge bovinos e equinos; Raiva selvática, transversal a todas as espécies de morcegos; e Raiva silvestre, englobando, entre outras espécies, raposas, coiotes e lobos. Os ciclos fecham-se no Homem, passível de ser infectado por todas as outras espécies. [Barecha, C.B. et al., 2017]

A nível mundial esta doença está disseminada em mais de 150 países e territórios, estando presente em todos os continentes, exceptuando a Antártida. Actualmente, a Ásia e a África serão os continentes mais preocupantes, onde ocorre 95% da mortalidade provocada por infecção do RABV registada em humanos, afectando predominantemente populações pobres e vulneráveis que vivem em áreas rurais e remotas. Os animais de companhia, nomeadamente a espécie canina, constituem o principal hospedeiro da infecção, de evolução quase sempre fatal, sendo responsáveis pela transmissão da doença que causa aproximadamente 70000 óbitos por ano. Quase metade destes incidentes ocorrem em crianças com idades inferiores a 15 anos.

Estes dados levaram a Organização Mundial de Saúde a instaurar programas de controlo da disseminação da doença através de campanhas profilácticas de vacinação de animais de companhia com idades superiores a 3 meses, prevenindo a transmissão do vírus à espécie humana. Concomitantemente, todos os anos, mais de 15 milhões de pessoas em contacto estreito com animais de companhia ou mordidas pelos mesmos, são submetidas a tratamento pós-exposição, estimando-se que este previna centenas de milhares de mortes. Por motivos relacionados com as directivas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e com a dificuldade de produção de soro hiperimune anti-Raiva, a terapia pós-exposição envolve apenas a toma de 5 doses vacinais calendarizadas em tempos precisos (dias 1, 7, 14, 21, 28). [Organização Mundial de Saúde, 2018]

1.1. Perspectiva Histórica

É uma das mais antigas e temidas doenças que afecta animais e humanos. Foi identificada no Egipto, por volta de 2300 A.C. e na Grécia antiga, onde foi descrita por Aristoteles. Para além de ser, provavelmente, a doença mais letal de todas as doenças infecciosas, a Raiva tem também a particularidade de ter estimulado uma das mais importantes descobertas das ciências biomédicas. Louis Pasteur, um iminente físico francês do séc. XIX, distinguiu-se no início da sua vida profissional, nas áreas de cristalografia e fermentação. Só mais tarde enveredou por linhas de investigação do foro das doenças infecto-contagiosas, sendo pioneiro no campo da vacinoterapia. A primeira vacina anti-rábica foi desenvolvida por Pasteur a partir de homogeneizados de medula espinhal de um cérebro de bovino vitimado pela doença, submetidos a um processo longo de dessecação. A estirpe, conhecida por estirpe Pasteur, ainda hoje é uma das raras estirpes cuja utilização para a manufactura de vacinas é permitida pela OMS. [Murphy et al., 1999]

1.2. Patogenia

A principal via de transmissão da Raiva é através de mordedura ou contacto com escoriações epidérmicas, uma vez que o vírus é eliminado de um animal infectado através da saliva. No entanto, constituem grupos de risco os técnicos de laboratório, os tratadores de morcegos e biólogos - visitantes assíduos de ecossistemas e sujeitos a infecção por aerossóis. Os casos raros de raiva decorrentes de transplantes, notificados nos EUA desde 2008, tornaram os potenciais dadores alvo de inquérito epidemiológico face a uma possível exposição ao vírus da Raiva. [Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2019] A evolução sintomatológica da doença está dependente do local da mordedura e sua proximidade do Sistema Nervoso Central (SNC), assim como da espécie animal envolvida (a carga viral de uma raposa infectada poderá atingir as 10^6 unidades infecciosas por mililitro de saliva). [Flint. et al., 2015]

Após deposição do vírus na porta de entrada, representada por células de músculo estriado e tecido conjuntivo, o vírus liga-se especificamente aos receptores nicotínicos da acetilcolina presentes nas junções neuro-musculares e penetra as terminações nervosas periféricas locais, motoras, sensoriais ou autónomas, quer directamente, quer após replicação primária no local de inoculação. A partir do sistema nervoso periférico (SNP), o vírus é conduzido ao SNC por transporte axonal retrógrado - assim designado por ser de natureza centrípeta - da terminação axonal ao corpo da célula neuronal. Este processo de transporte, embora lento - cerca de 5 a 10 mm por dia - é dinâmico, resultando da ligação da fosfoproteína, uma das 5 proteínas codificadas pelo vírus, à dineína, um dos componentes do citoesqueleto do axónio. Atingida a medula espinhal e o SNC, a replicação viral é selectiva a determinadas estruturas nobres do cérebro, destacando-se o cerebelo, hipocampo e córtex. Embora não sendo citolítico, o RABV não só atinge estruturas envolvidas nas

funções cognitivas, como ainda compromete determinadas funções neuronais, tais como a síntese de enzimas precursoras de determinados neurotransmissores, o que está na origem das alterações comportamentais observadas - sintomas clínicos de agressividade, no caso da Raiva furiosa, ou de letargia, no caso da Raiva muda. Após síntese de novas partículas virais, ocorre a disseminação centrífuga passiva para vários órgãos de replicação secundária, com especial relevância para as glândulas salivares. Uma vez atingidas as células glandulares, a libertação de viriões ocorre por um processo de gemulação, através do lado apical da célula directamente voltado para os ductos glandulares, o que explica a elevada infecciosidade da saliva. [Jackson, 2003, Barecha, 2017, Begeman, 2017]

1.3. Taxonomia

O RABV é considerado o protótipo taxonómico do género *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae* que inclui outras espécies que estão genética e antigenicamente relacionadas. O RABV está distribuído mundialmente e é responsável pela grande maioria dos casos descritos de infeções em animais de companhia, humanos e raposas. As outras espécies de lyssavírus têm uma distribuição geográfica mais reduzida, e, a grande maioria, é representada por estirpes que infectam morcegos frugívoros, insectívoros, e/ou hematófagos, importantes vectores da doença. [Warrell, 2004] Com base na investigação filogenética da sequência do gene que codifica a Nucleoproteína (N), e no comportamento da espécie hospedeira foram inicialmente estabelecidos 4 grupos filogenéticos, e reconhecido um quinto em duas espécies de quirópteros *Pipistrellus* e *Lasionycteris*, com patogenicidade e imunogenicidade distintas [Davis et al., 2006; Franka et al., 2006; Kuzmin et al., 2010].

No campo da profilaxia médica, é de salientar a evolução da vacinoterapia desde o século XIX até à actualidade. À vacina produzida por Louis Pasteur, sucederam-se as vacinas produzidas *in vivo*, numa primeira fase em cérebro de borrego e, posteriormente, em ratinho de mama, as quais eram inactivadas com formol ou beta-propiolactona. Estas vacinas consideradas de “1ª geração” foram progressivamente abandonadas pelo facto de provocarem inúmeras reacções adversas nos animais imunizados, em particular o aparecimento de tumores no local de inoculação. Nos anos vindouros, a produção das vacinas que passaram a ser conhecidas como vacinas de “2ª geração” envolveram a adaptação da estirpe parental a ovos embrionados e/ou células embrionárias de pinto. Embora utilizadas ainda na actualidade, estas vacinas foram preteridas em favor das vacinas de “3ª geração”, produzidas em culturas celulares contínuas (Vero, HEC, etc...), cujo poder antigénico e imunogénico é muito superior. Constata-se, no entanto, que mesmo as vacinas de “3ª geração” poderão não fornecer imunidade cruzada contra todos os genótipos de lyssavírus. Para além disso, não foi observada imunidade cruzada contra lyssavírus dos filogrupos 2 e 3 [Badrane, 2001; Brookes, 2005; Hanlon, 2005].

1.4. Quadro Clínico

Em animais de companhia, o período de incubação da doença é variável - de 3 a 8 semanas em canídeos e de 2 a 6 semanas em felídeos. Distinguem-se três formas clínicas de infecção: prodrômica, furiosa e paralítica. A fase prodrômica, de 2 a 3 dias de duração, caracteriza-se por alterações comportamentais. Após esta fase, os animais infectados entram em fase furiosa, marcada por alterações cognitivas, acessos de agressividade, hiperestesia, prurido intenso e até automutilação. Alguns animais podem desenvolver uma terceira fase paralítica, quer imediatamente após a fase prodrômica, quer após a fase furiosa. Esta fase de 2 a 4 dias de duração é caracterizada por espasmos dos músculos com início na região da cabeça e faringe, o que provoca impossibilidade de deglutição e hidrofobia. A progressão da paralisia muscular abrange o diafragma, com decorrentes dificuldades respiratórias e, finalmente, os membros com paraplegia. A morte ocorre por paragem cardio-respiratória. [Murphy et al., 1999]

1.5. Diagnóstico

No início do século XX, os corpúsculos de Negri eram considerados patognomónicos da infecção pelo vírus da raiva. Os corpúsculos de Negri representam a lesão microscópica típica do diagnóstico anátomo-patológico. São corpos de inclusão eosinofílicos, redondos ou ovais, detectados maioritariamente nos *perikarya* neuronais, dendrites das células piramidais do hipocampo e células de Purkinje do cerebelo. Conotados como “fábricas de vírus” porque estes agregados de material filamentoso ou granular, são constituídos por ribonucleoproteína viral. [Kimmo et al., 2014] Actualmente, com o aparecimento de novas técnicas, o diagnóstico laboratorial baseia-se em três técnicas, nomeadamente por detecção de antígeno em esfregaços (*Fluorecent Antibody Test* - FAT), isolamento de vírus em células neuronais (*Rabies Tissue Culture Infection Test* - RTCIT) e detecção por amplificação de genoma viral (*Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction* - RT-PCR). O diagnóstico serológico ante-mortem não é usado regularmente devido à lenta seroconversão. Porém, este tipo de diagnóstico é muito útil na avaliação dos níveis de seroconversão após vacinação assim como para estudos epidemiológicos [OIE - *World Organisation for Animal Health*, 2019; Fooks et al., 2009].

1.6. Propriedades dos *Rhabdovirus*

1.6.1. Classificação

A família *Rhabdoviridae* está dividida em vinte géneros. Com base na sequência nucleotídica do gene que codifica para a Nucleoproteína (N), na espécie hospedeira e na distribuição geográfica, o género *Lyssavirus* subdivide-se em 8 grupos distintos que incluem 7 genótipos e um grupo de vírus ainda não classificados. São eles o Genótipo 1 representado pelo RABV, protótipo do género, endémico ou epidémico em carnívoros domésticos e selvagens, quirópteros insectívoros e hematófagos; o Genótipo 2 representado pelo Vírus do Morcego de Lagos (*Lagos Bat Virus* - LBV), isolado de morcegos frugívoros na África do Sul, Zimbabué, Senegal e Etiópia, o Genótipo 3, representado pelo Vírus Mokola (MOKV), isolado em roedores (musaranhos) na Nigéria, África do Sul, Zimbabue e Etiópia, o Genótipo 4, representado pelo Vírus de Duvenhage (*Duvenhage Virus* - DUVV), isolado em morcegos frugívoros na África do Sul e Senegal, o Genótipo 5 representado pelo *Lyssavirus* do Morcego Europeu tipo-1 (*European Bat Lyssavirus type-1* - EBLV-1), isolado em morcegos insectívoros das espécies *Eptesicus serotinus*, *Lasionycteris noctivagans* e *Pipistrellus subfusus*, entre outras, o Genótipo 6, representado pelo EBLV-2, isolado maioritariamente em morcegos insectívoros das espécies *Myotis myotis* e *Myotis daubentonii*, e o Genótipo 7, representado pelo *Lyssavirus* do Morcego Australiano (*Australian Bat Lyssavirus* - ABLV), isolado na Austrália em morcegos frugívoros e raposas voadoras (*Pteropus alecto*). [Vazquez, 2011; McCall, 2000] Outras quatro espécies de lyssavírus, identificadas na região da Eurásia - Vírus Aravan (ARAV), Vírus Khujand (KHUV), Vírus Irkut (IRKV) e o West Caucasian Bat Virus (WCBV) fazem parte de um grupo de vírus sem classificação. [Botvinkin, 2003; Markotter, 2008; Hayman, 2008; Kuzmin IV, 2010; Marston, 2012]

1.6.2. Propriedades do viri3o

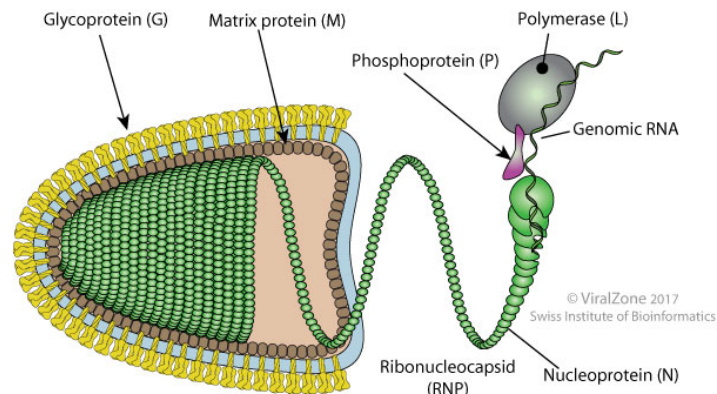


Figura 1 - Estrutura do viri3o caracter3stico da fam3lia *Rhabdoviridae*. *Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics*.

O viri3o dos Rhabdov3rus tem aproximadamente 70 nm de di3metro e 170 nm de comprimento e consiste num inv3lcro com pepl3meros dentro do qual est3 localizada a nucleoc3pside helicoidal, de forma cil3ndrica. 3e3o precisamente esta estrutura que confere a estes v3rus a sua forma c3nica ou em forma de bala. O genoma viral 3e3o constitu3do por uma c3pia 3nica de cadeia simples de polaridade negativa, com 11 a 15 Kb. No caso do RABV, o seu genoma 3e3o composto por 11932 nucle3tidos. O genoma 3e3o dividido em 5 genes na ordem 3'-N-NS-M-G-L-5'. Os 5 genes codificam para as 5 prote3nas: L (2142 amino3cidos), a polimerase de RNA dependente de RNA que funciona na transcri33o e na replica33o de RNA; G (505 amino3cidos), a glicoprote3na que, organizada em tr3meros, forma os pepl3meros; N (450 amino3cidos), a nucleoprote3na, principal componente da nucleoc3pside; P (297 amino3cidos), um componente da polimerase viral; e M (202 amino3cidos), a prote3na que facilita a sa3da do viri3o por gemula33o, ligando-se 3o nucleoc3pside e ao dom3nio citoplasm3tico da glicoprote3na. As prote3nas N, P e L, em associa33o com o RNA viral constituem a nucleoc3pside. A glicoprote3na cont3m ep3topos indutores de anticorpos neutralizantes que ser3o os alvos de elei33o para a imunidade induzida por vacina33o. A glicoprote3na e a nucleoc3pside ter3o ep3topos neutralizantes envolvidos na imunidade celular. Os viri33es possuem ainda l3pidos e hidratos de carbono origin3rios da membrana citoplasm3tica e que constituem o inv3lcro. [Murphy et al., 1999]

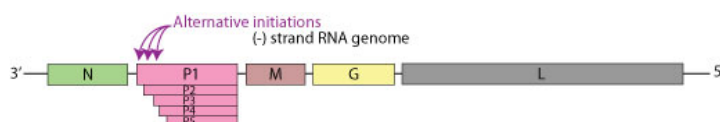


Figura 2 - Organiza33o gen3mica caracter3stica de um Lyssav3rus. *Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics*.

1.6.3. Ciclo replicativo

A adsorção do virião à célula do hospedeiro ocorre por ligação da glicoproteína G do invólucro viral ao receptor nicotínico da acetilcolina, presente na membrana citoplasmática da célula hospedeira. É oportuno ressaltar que diferentes estirpes do RABV, nomeadamente as fixas, detêm a capacidade de utilizar receptores ubiqüitários, tais como o receptor do factor de crescimento neuronal (p75NTR), a molécula de adesão da célula neural (*Neural Cell Adhesion Molecule* - NCAM), gangliosídeos. [Tuffereau *et al.*, 1998; Thoulouze *et al.*, 1998]

A penetração do vírus na célula hospedeira constitui o segundo passo do ciclo replicativo e dá-se por endocitose, um processo que envolve a fusão do invólucro viral com a membrana da vesícula endocítica. Após descapsidação, o complexo RNP fica livre no citoplasma e tem início o ciclo replicativo viral que começa por envolver a transcrição de mRNA a partir de RNA genómico através da polimerase do virião. Numa segunda fase, a partir das proteínas que são traduzidas a partir dos mRNAs virais, ocorrerá a produção de moléculas-molde de polaridade positiva que, por sua vez, serão usadas para a síntese de RNA genómico. Tendo como molde o RNA do virião, a transcriptase irá proceder à transcrição de 5 mRNAs sub-genómicos. Existe apenas um local promotor, localizado na extremidade 3' do genoma viral. Assim, a polimerase liga-se ao RNA molde neste local e vai seguindo ao longo do RNA viral e vai encontrando sequências sinalizadoras de início e fim de transcrição nas regiões intergénicas, nas fronteiras das sequências de cada um dos genes. Apenas uma proporção do número inicial de moléculas de polimerase seguem para o gene seguinte, continuando o processo de transcrição. Este mecanismo chamado transcrição atenuada ou transcrição *stop/start* resulta numa maior produção de mRNA resultantes dos genes que estão mais próximos da extremidade 3', que, de uma forma gradual, vai decrescendo no sentido dos genes que estão localizados mais perto da extremidade 5': N>P>M>G>L. Desta forma, resultará deste processo uma maior produção de proteínas estruturais como N (nucleocápside) relativamente a L (polimerase de RNA).

A ligação das moléculas de nucleoproteína às recém-formadas moléculas de RNA viral leva à formação de moléculas de Nucleocápside com enrolamento helicoidal. Através da acção das proteínas M, as proteínas N são por sua vez ligadas à membrana celular nos locais onde os peplómeros estão inseridos.

A fase final do ciclo replicativo consta de dois passos: morfogénese e libertação dos viriões da célula infectada. O primeiro envolve a reunião dos componentes recém-sintetizados, começando pelo complexo ribonucleoproteína (RNP), englobando 3 constituintes: o RNA de polaridade negativa, a nucleoproteína (N) e a polimerase (L), ao qual se juntam inicialmente a fosfoproteína (P) e a proteína transmembranária da matriz (M), e, por fim, a proteína G recém-glicosilada no aparelho de Golgi. A libertação dos viriões ocorre por gemulação através da membrana citoplasmática. [Finke *et al.*, 2005]

O ciclo replicativo do RABV é caracteristicamente lento e não lítico, uma vez que não resulta em destruição da célula hospedeira de fenótipo neuronal ou, não neuronal, nem neuronofagia. [Murphy *et al.*, 1999]

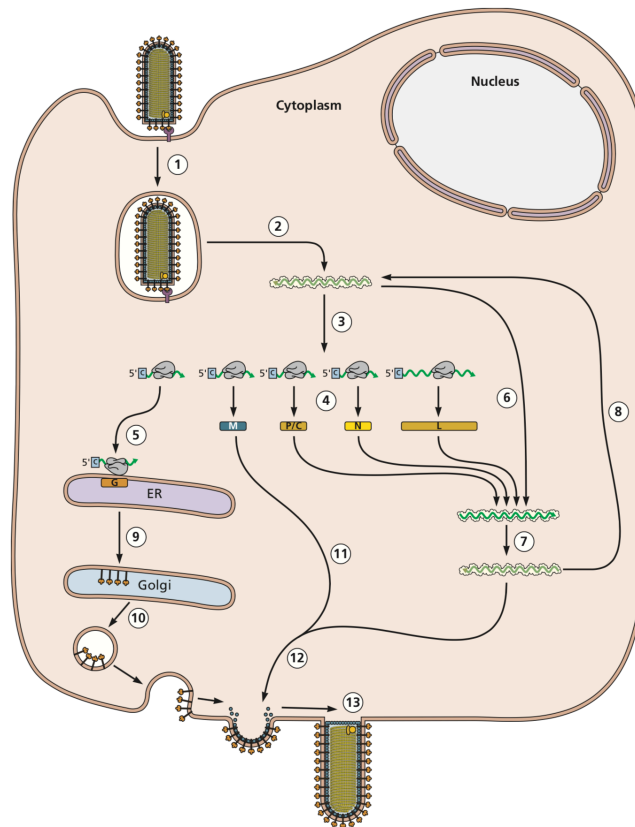


Figura 3 - Ciclo replicativo de um Rhabdovírus. [Flint et al., 2015]

1.7. Relação entre a expressão da Glicoproteína G do RABV, apoptose e patogenicidade

O mecanismo patogénico que poderá contribuir para a profunda disfunção do sistema nervoso central, característica da Raiva, poderá ser a diminuição das funções neuronais. Tem sido demonstrado que a expressão dos genes constitutivos é marcadamente reduzida em neurónios infectados com RABV, resultando na inibição generalizada da síntese proteica. [Fu et al., 1993]

No que diz respeito à patologia induzida pelo RABV, a morte celular por apoptose tem sido o mecanismo proposto como potencialmente patogénico, em modelos experimentais *in vivo*, particularmente ratinhos infectados com estirpes fixas de RABV (*Challenge Virus Standard* - CVS). [Jackson et al., 1997]

A morte celular, ou seja, a perda irreversível da estrutura e funções vitais da célula, ocorre por dois processos morfologicamente distintos: necrose e apoptose.

A necrose é um processo passivo, induzido na célula por substâncias tóxicas, ou, agentes infecciosos, de que resulta a perda da integridade de membrana e libertação

dos constituintes no meio extracelular, os quais estimulam uma resposta inflamatória por parte do organismo.

A apoptose é um processo activo de morte celular geneticamente programada, fundamental na manutenção da homeostase no organismo, quer durante o desenvolvimento embrionário, quer como peça-chave na eliminação de células pró-oncogénicas, e/ou infectadas por vírus.

Consiste numa sequência ordenada de eventos celulares que afectam a transcrição e a tradução de sequências genómicas específicas, e a activação de endonucleases que clivam o DNA em subunidades nucleossomais. Estas alterações traduzem-se em alterações morfológicas específicas que afectam o núcleo (condensação da cromatina e picnose) e o citoplasma da célula, comprometendo a integridade do citoesqueleto, e colapsando a estrutura celular. A apoptose é mediada quer pela activação em cascata de caspases (-3, -6 e -7), uma família de proteases de cisteína, elementos constitutivos da célula. Na actualidade, considera-se a existência de duas vias apoptóticas que convergem na activação da caspase 3, a qual dá início ao processo de apoptose. A primeira via, intrínseca, é regulada por mitocôndrias e regulada pela activação da caspase 9, a segunda, extrínseca, iniciada pelo receptor de superfície e mediada pela activação das caspases 8 e 10. O resultado final é a alteração da distribuição dos lípidos nos folhetos da membrana citoplasmática e a compactação do conteúdo celular em pequenos aglomerados, denominados corpos apoptóticos, posteriormente fagocitados por macrófagos circulantes ou células adjacentes. (Nicoletti et al., 2000; Thomson, B. 2001). Resumindo, a apoptose é um mecanismo de defesa anti-viral inata, que não só limita a replicação viral por eliminação das células infectadas, como ainda é um factor adjuvante da disseminação do vírus no organismo, particularmente na fase tardia de infecção.

Foi demonstrado que o vírus da raiva induz apoptose *in vivo* e *in vitro*, e por ambas as vias: via mitocondrial, triada pela proteína da matriz (M), e por via extrínseca dependente ou não de caspase na fase final de infecção. [Gholami A. et al. (2008), Zan et al., 2016]. Regra geral o aparecimento de apoptose está relacionado com a multiplicidade de infecção e o fenótipo celular utilizado. No entanto, no caso da Raiva, ou porque os valores quantificáveis de vírus infeccioso *in vitro*, em células neuronais e/ou não neuronais, não ultrapassam 10^{-6} TCID₅₀/ml, mesmo às 40 horas após infecção, e a duração do ciclo replicativo em células de diferenciação terminal como os neurónios é longa, os sinais indicativos de apoptose não foram evidentes nos tempos estudados, sugerindo que, a ocorrer, este processo é tardio.

A sequência nucleotídica do gene que codifica para a Glicoproteína G do RABV tem um papel crucial no fenótipo patogénico das estirpes, o qual tem uma relação inversa com a apoptose. Além de constituir o factor determinante da patogenicidade das estirpes, a proteína G acumula outras funções importantes, quer na interacção vírus-célula, intervindo no passo de adsorção, quer na imunidade humoral na qualidade de principal alvo dos anticorpos que neutralizam o poder infeccioso do vírus. Neste sentido, tem sido demonstrado que a patogenicidade das estirpes avianizadas: ERA (Evelyn gaynor, Roktinicki, Abelseh) e Flury HEP (High Egg Passage), da estirpe atenuada SAD B19 (Street Alabama Dufferin) adaptada a culturas celulares está correlacionada com a presença de um determinante antigénico III, localizado na posição 333 da grelha de leitura do gene G. Da mutação pontual deste codão resulta

a síntese do aminoácido glicina (Gln) em vez da arginina (Arg) o que altera não só o nível de síntese da proteína como a sua estrutura terciária e, consequentemente, o ciclo replicativo viral e suas consequências para a célula hospedeira. [Tao *et al.*, 2010]

As estirpes de RABV de rua, que são consideradas mais patogénicas que as estirpes adaptadas a culturas celulares, expressam níveis muito baixos de proteína G e não induzem a apoptose até chegar à fase final do ciclo de infecção, sugerindo que a patogenicidade de um determinado vírus estará inversamente correlacionada com a expressão de proteína G e com a sua capacidade de induzir a apoptose. [Morimoto *et al.*, 1999] No entanto, o mecanismo pelo qual o gene G do RABV medeia o processo de sinalização de apoptose mantém-se relativamente desconhecido. Contudo, tem sido especulado que a proteína G, uma vez ultrapassando um certo nível de expressão, irá perturbar drasticamente a membrana celular, resultando na activação de proteínas que desencadeiam as cascatas de apoptose. A sobreexpressão da Glicoproteína do RABV resulta na estimulação da apoptose e da resposta imune. [Faber *et al.*, 2002]

Por outro lado, a infecção por RABV e, em particular, a sobreexpressão de Glicoproteína G poderá resultar em piroptose, um mecanismo de morte celular semelhante à apoptose que, ao contrário desta, envolve a activação de caspase 1 e, assim, desencadear o processo de necrose [Ting, 2008]. O processo de necrose prolongado ou piroptose causado pela infecção pelo RABV parece desempenhar um papel decisivo na indução da imunidade anti-viral. Enquanto as células apoptóticas mantêm a membrana celular íntegra e não estimulam respostas imunes inatas, as células necróticas tornam-se permeáveis, libertando adjuvantes endógenos que poderão desencadear uma resposta imune inata. [Kono *et al.*, 2008]

Uma vez que o nível de apoptose/necrose se correlaciona com a imunogenicidade do RABV, tem sido ponderada a hipótese de que o efeito potenciador de imunidade das células apoptóticas/necróticas poderá gerar uma resposta imune protectora. [Faber 2002] Consequentemente, a regulação da expressão de proteína G do RABV poderá muito provavelmente constituir um factor na patogénese da Raiva, uma vez que fornece meios para que as variantes patogénicas do RABV sobrevivam e sejam distribuídas pelo sistema nervoso sem causar dano neuronal notório o que induziria uma resposta imune protectora que interferiria com a infecção. [Dietzschold *et al.*, 2008]

A expressão de Glicoproteína G pode ser regulada ao nível da síntese de RNA, ao nível pós-tradução ou em ambos. Tem sido demonstrado que os níveis de proteína G expressa por diferentes variantes quiméricas de RABV são reflectidos pelo nível de síntese de RNA, indicando que a regulação diferencial de expressão de proteína G destas variantes é o resultado das variações nos níveis de transcrição de mRNAs. [Pulmanusahakul *et al.*, 2008]

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a influência da glicoproteína G do vírus da raiva na replicação *in vitro* e indução de apoptose na célula hospedeira.

A cinética de replicação dos vírus em estudo foi avaliada por RT-qPCR e expressão de uma proteína precoce (N) e de outra tardia (G) por imunofluorescência. A apoptose foi avaliada através das alterações do DNA celular.

A nossa proposta inicial de trabalho baseava-se na premissa de que a estirpe SAD Bern, vírus de rua isolado no cérebro de um cão e posteriormente atenuado (SAD B19) por passagens sucessivas em culturas de células não neuronais (*Baby Hamster Kidney* - BHK21), é manifestamente apoptótica, enquanto que a estirpe protótipo do genótipo 1, supostamente não apoptótica. A comparação das duas estirpes não foi possível uma vez que, infelizmente, a estirpe SAD Bern não está disponível comercialmente e o laboratório de referência não mostrou disponibilidade em cedê-la.

Dessa forma, foi então decidido comparar dois genótipos distintos, genótipo 1 (CVS-11, estirpe fixa, atenuada *in vitro* por passagens seriadas em culturas celulares BHK-21, e CVS-27, estirpe fixa, atenuada *in vivo* por passagens seriadas em cérebro de ratinho lactante) e genótipo 5 (EBLV-1, estirpe virulenta isolada em morcegos e submetida a 3 passagens (não adaptada) em células Neuro2A). Relativamente a este último desconhecemos qualquer publicação sobre a indução da apoptose por esta estirpe.

2. Materiais e Métodos

2.1. Estirpes de vírus da Raiva

Estirpe CVS-11 - estirpe fixa, derivada da estirpe Pasteur (PV), atenuada *in vitro* por passagens seriadas em culturas celulares de rim de *hamster* (*Baby Hamster Kidney* - BHK-21). Esta estirpe foi obtida a partir do Laboratório de Referência da O.I.E. para a Raiva, *Nancy Laboratory for rabies and wildlife*, Nancy, França.

Estirpe CVS-27 - estirpe fixa, derivada da estirpe Pasteur (PV), atenuada *in vivo* por passagens seriadas em cérebro de ratinho lactante. Esta estirpe foi obtida a partir de macerados de cérebros de ratinho inoculados do Laboratório de Referência, e enviados para Portugal, como amostras de inóculos a classificar, ao abrigo dos Testes de Proficiência.

Estirpe EBLV-1, estirpe virulenta isolada em células de neuroblastoma, a partir de inóculos procedentes do Laboratório de Referência.

Todas as estirpes foram mantidas a -80°C, sob a forma de sobrenadantes de culturas celulares de neuroblastoma murino, N2A, até à sua utilização.

2.2. Culturas Celulares

Culturas celulares de neuroblastoma murino (N2a) (ATCC: CCL-131) foram cultivadas em Meio de Eagle modificado (*Modified Eagle's Medium* - MEM), suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (*Fetal Bovine Serum* - FBS), 5% de triptose (*Tryptose Phosphate Broth*), aminoácidos não essenciais e uma mistura antibiótico-antimicótico (*Gibco Life Technologies*) e mantidas numa estufa a 37°C, em ambiente com 5% de CO₂.

2.3. Inoculação de culturas celulares com o vírus da Raiva

Pelo facto de o RABV apresentar um crescimento lento, mesmo em células permissivas à infecção, e a replicação ser dependente da fase mitótica da célula hospedeira, a preparação dos *stocks* de vírus passou pela preparação de monocamadas de células N2A em fase exponencial de crescimento, isto é, a cerca de 75% de confluência. Estas células foram tripsinizadas pelo processo enzimático habitual (destacadas por aplicação de Tripsina-EDTA) e submetidas a uma lavagem

em MEM simples, a fim de retirar eventuais resíduos de soro, inibidor da adsorção do vírus ao receptor celular. Após centrifugação a 250 xg durante 8 min, e ressuspensão do sedimento celular em MEM, as células foram contadas num hematocítmetro de Bürker. A este volume foram adicionados cada um dos inóculos, previamente titulados, de modo a obter uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de sensivelmente 2 partículas de vírus/célula. De modo a facilitar o processo de adsorção sincrónica, cada uma das suspensões de células e vírus foi incubada a 4°C, durante 1 h, e agitada a intervalos de 15 min. Findo o período de adsorção, a suspensão foi centrifugada a 250 xg durante 10 min e as células infectadas sedimentadas foram ressuspensas em MEM com 10% de FBS e placadas. As culturas foram incubadas durante 72 h a 37°C em atmosfera de CO₂ durante 72 h adicionais a fim de maximizar a produção de vírus.

2.4. Titulação de vírus em FID50 (*Fluorescent Infectious Dose 50*)

No sentido de aferir e normalizar os sobrenadantes de culturas de células infectadas com cada uma das estirpes de modo a obter um título de 5x10⁵ Unidades Fluorescentes Infecciosas (IFU/mL), os títulos de vírus extracelular foram determinados pelo método *Fluorescent Antibody Virus Neutralisation Test* (FAVN).

Monocamadas confluentes de células Neuro2A, com 24 h de incubação, preparadas em placas de 96 poços (Sarstedt) foram inoculadas sob um volume de 100 µL/poço de 8 diluições seriadas de cada uma das estirpes de vírus utilizadas nos ensaios (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸). Foram efectuadas 10 réplicas/diluição. A adsorção teve lugar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, por um período de 1 h, findo o qual as células foram cobertas com 100 µL de MEM suplementado com 5% de FBS, 5% de triptose e antibiótico/antimicótico. As placas foram reincubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante um período de 3 dias. No final do tempo de incubação, o meio de cultura foi aspirado e a monocamada celular lavada com tampão fosfato-salino, pH 7,4 (*Phosphate Buffered Saline* – PBS). As células foram então fixadas com 200 µL de acetona a 80% durante 30 min à temperatura ambiente. Após retirar a acetona, as placas foram deixadas a secar por evaporação durante 1 h, após o que foram incubadas a 37°C, por um período de 1 h, sob um volume de 50 µL/poço, na presença de um anticorpo policlonal, imunoglobulina anti-nucleocápside conjugada com isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate* - FITC) (*BioRad*) diluído a 1/20 em tampão PBS pH 7,2, segundo indicação do fabricante.

As células infectadas foram observadas em microscopia de fluorescência (*Nikon Eclipse Ti-S Intensilight C-HGFI*). O fluoróforo FITC absorve a um comprimento de onda de 496 nm (espectro azul) e emite no comprimento de onda de 520 nm (espectro verde). A leitura efectuada neste ensaio é qualitativa, ou seja, qualquer poço no qual tenha sido detectada fluorescência específica foi considerado positivo. O título foi calculado usando o método de Spearman-Kärber.

2.5. Cinéticas de Expressão de Proteínas do Vírus da Raiva

Células N2a em estado de 75% de confluência, cultivadas em placas de 96 poços, foram inoculadas às 24 h de incubação a 37°C, com cada uma das três estirpes virais a uma multiplicidade de infecção (m.o.i) de 2, e mantidas na estufa em atmosfera com 5% de CO₂. A diferentes tempos após infecção - 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h e 48 h - 2 placas contendo 20 réplicas de cada um dos inóculos - CVS-11, CVS-27 e EBLV-1 - foram processadas por fixação com acetona a 80% e secagem, de acordo com o protocolo previamente descrito.

2.6. Imunofluorescência Directa (IFD) para detecção do antígeno nucleocápside

As monocamadas celulares foram lavadas com tampão fosfato-salino, pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline – PBS). As células foram então fixadas com 200 µL de acetona a 80% durante 30 min à temperatura ambiente. Após retirar a acetona, as placas foram deixadas a secar por evaporação durante 1 h, após o que foram incubadas a 37°C, por um período de 1 h, sob um volume de 50 µL/poço, na presença de um anticorpo policlonal, imunoglobulina anti-nucleocápside conjugada com isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein Isothiocyanate - FITC) (BioRad) diluído a 1/20 em tampão PBS pH 7,2, segundo indicação do fabricante.

As células infectadas foram observadas em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse Ti-S Intensilight C-HGFI). O fluoróforo FITC absorve a um comprimento de onda de 496 nm (espectro azul) e emite no comprimento de onda de 520 nm (espectro verde).

2.7. Imunofluorescência Indirecta (IFI) para detecção do antígeno glicoproteína

A cinética de expressão da glicoproteína (proteína G), foi estudada por imunofluorescência indirecta e consistiu em dois passos. No primeiro, as células infectadas, já fixadas, foram incubadas a 37°C, em câmara húmida, com um anticorpo primário - anticorpo monoclonal anti-glicoproteína (*Thermo Fischer Scientific*) - diluído a 1:200, segundo instruções do fornecedor. Dois passos de lavagem com o tampão PBS precederam a incubação das células a 37°C, por um período adicional de 60 min, com o anticorpo secundário - Imunoglobulina G de cabra anti-ratinho conjugada com o fluorocromo Alexa (*Alexa Fluor 488 - Molecular Probes*) diluído a 1:500. Ambos os anticorpos foram incubados sob o volume de prova de 50 µL. A detecção da proteína G foi efectuada em microscopia de fluorescência.

2.8. Cinética de Replicação do Vírus da Raiva

2.8.1. Extração de Ácidos Nucleicos

O RNA total de células Neuro2A infectadas com cada uma das estirpes de vírus em estudo foi extraído a diferentes tempos após a inoculação conforme indicado anteriormente. Procedeu-se do mesmo modo para uma de células não inoculadas, para determinar o número de cópias de genoma viral intra-celular. Para tal, após retirar o meio de cultura o tapete celular foi destacado por raspagem. As células foram sedimentadas por centrifugação 300 x g durante 10min. O sedimento de células foi ressuspensas em 5 mL de PBS. Desta suspensão foram retirados 200 µL para a extração automática de ácidos nucleicos no robot *BioSprint 96*, usando o *kit Qiagen MagAttract-96 cador Pathogen*, seguindo as instruções do fabricante.

2.8.2. Amplificação parcial dos genes N e G por RT-PCR e RT-qPCR

A amplificação parcial dos genes N e G foi realizada por reacção de polimerase em cadeia precedida de uma reacção de transcriptase reversa (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction - RT-PCR*), utilizando como molde o RNA das amostras. Para as estirpes fixas, CVS-11 e CVS-27, foram utilizados os mesmos sistemas de amplificação para os genes N e G, uma vez que as sequências das regiões em questão são conservadas nestas duas estirpes. Para a amplificação dos fragmentos pertencentes aos genes N e G das duas estirpes CVS, foi utilizado o sistema publicado por Morimoto et al. e Heaton et al.

Para amplificação do gene N e G do genótipo 5, EBLV-1, foram desenhados *primers* com base nas sequências disponíveis na plataforma do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, utilizando a *Basic Local Alignment Tool (BLAST)*. Seguidamente, foram seleccionadas pequenas sequências com aproximadamente 20 pares de bases (pb) conservadas, que flanqueiam as regiões a amplificar.

Procedeu-se do mesmo modo para a escolha das sondas utilizadas em RT-qPCR, marcadas com os fluróforos FAM na extremidade 3' e TAMRA na extremidade 5'. O conjunto de *primers* e sondas, bem como as condições de amplificação estão indicados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Primers e sondas utilizados para RT-PCR e RT-qPCR.

Nome	Tipo	Gene e Posição no Genoma	Sequência Nucleotídica (5' → 3')
CVS-GF	<i>Primer Directo</i>	G - 5165	GATGACTCTGTGCTTGGGCA
CVS-GP	Sonda	G - 5188	TTGATTCATGTCGAGTCCGCT
CVS-GR	<i>Primer Reverso</i>	G - 5234	AAAGAGGTCGTAGTGTGCCCCCCGA
EBLV-1-GF	<i>Primer Directo</i>	G - 3348	CTTGAACGTGTGCTCCTTGTC
EBLV-1-GP	Sonda	G - 3376	TTCCCAATYTACACCATCCCGGATA
EBLV-1-GR	<i>Primer Reverso</i>	G - 3429	TATATCAATAGGACTCCACGG
CVS-NF	<i>Primer Directo</i>	N - 61	CACCYCTACAATGGATGCCGAC
CVS-NP	Sonda	N - 92	TTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCT
CVS-NR	<i>Primer Reverso</i>	N - 201	CCTAGRGTATACAGGGYTTTTTC
EBLV-1-NF	<i>Primer Directo</i>	N - 29	TAGACAYGKTCATYGATAGA
EBLV-1-NF	Sonda	N - 55	ATGTAACACCYCTACAATGGATG
EBLV-1-NF	<i>Primer Reverso</i>	N - 116	GARACCARYTGATTATGGAC

Tabela 2 - Condições de amplificação parcial dos genes N e G por RT-PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Transcrição Reversa	45°C	15 min	1
Activação	95°C	10 min	1
Desnaturação	95°C	15 s	50
Hibridação	53°C	30 s	
Extensão	72°C	30 s	
Extensão Final	72°C	8 min	1
Pausa	20°C	∞	-

Tabela 3 - Condições para as reações de RT-qPCR.

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Transcrição Reversa	45°C	15 min	1
Activação da polimerase de DNA	95°C	10 min	1
Desnaturação	95°C	15 s	50
Hibridação/ Extensão, com leitura de fluorescência	60°C	30 s	

2.8.3. Clonagem

Os produtos de RT-PCR dos genes N e G obtidos anteriormente foram purificados após electroforese em gel de agarose, usando o *kit NZYtech Gelpure*, seguindo o protocolo do fabricante. Os produtos purificados foram então ligados ao vector *pCR 2.1*, usando o *kit Invitrogen TA Cloning Kit*. Para cada produto de RT-PCR, foi preparada a mistura de ligação indicada na Tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes constituintes da mistura de ligação.

Componente	Volume (µL)
Produto de RT-PCR	2
Tampão de Ligação	2
Vector <i>pCR 2.1</i>	2
Enzima <i>Express Link T4 DNA Ligase</i> (5 unidades)	1
Água livre de nucleases	3

As misturas foram incubadas a 25°C, durante 1 h. Para a posterior transformação, foram usadas células *E. coli* competentes *Invitrogen One Shot Competent Cells* que foram descongeladas e mantidas em gelo. Desta forma, foi usado um tubo com 50 µL de células competentes por cada mistura de ligação e foi pipetado 1 µL desta, agitando a solução suavemente com a ponta da pipeta. Seguiu-se uma incubação de 30 min em gelo e um choque térmico de 42°C durante 30 s, seguido de transferência

imediate para gelo. Adicionaram-se 250 µL de meio S.O.C. (*Super Optimal Broth* com repressão de catabólitos) e colocaram-se os tubos em incubação de 1 h a 37°C, com agitação contínua de 225 rpm. Findo este período, o volume de cada tubo foi semeado em placas de agar LB com 50 µg/mL de canamicina, 40 µL de X-Gal a 40 mg/mL e 40 µL de IPTG 100 mM, e foram incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, as colónias brancas foram repicadas para meio LB com 50 µg/mL de canamicina. Após nova incubação de 37°C durante a noite, retiraram-se 2 mL da cultura e o sedimento de células obtido após centrifugação a 8000 xg durante 1 min foi ressuspendido em 750 µL de tampão STET (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, Trinton X-100 a 5%) com 7,5 µL de lisozima a 20 ng/mL e 4 µL de RNase a 10 ng/mL. As misturas foram submetidas a um banho de 100°C durante 5 min e foram novamente centrifugadas a 21000 xg durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 750 µL de isopropanol e as amostras foram misturadas por inversão dos tubos e centrifugadas a 21000 xg durante 10 min a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspendido após secagem em 50 µL de água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). A eficiência das ligações foi confirmada por digestão com 0,5 µL de enzima *EcoRI* (20000 U/mL), durante 1 h, a 37°C por electroforese executada a 100 V (10 V/cm) durante 50 min.

2.8.4. Transcrição *in vitro*

Para proceder à transcrição *in vitro* dos 4 produtos de RT-PCR envolvidos neste estudo, foi usado o *NZY T7 High Yield RNA Synthesis kit*. Este *kit* foi desenvolvido para a produção de grandes quantidades de transcritos de RNA a partir de qualquer DNA molde sujeito ao controlo de uma sequência promotora T7. A reacção de transcrição *in vitro* é processada por uma polimerase de RNA do fago T7. A mistura para cada uma das reacções foi preparada de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Componentes das reacções de ligação.

Componente	Volume (µL)
Tampão de Reacção 10x HY	2
ATP 100 mM	1
CTP 100 mM	1
GTP 100 mM	1
UTP 100 mM	1
DNA-molde	1
Mistura de Enzima T7 HY	1
Água livre de nucleases	12

As misturas foram incubadas a 37°C durante 2 h. De forma a eliminar o DNA contaminante nas amostras, procedeu-se a uma incubação a 37°C durante a noite com DNase I (1 U/reacção). A eficiência deste tratamento foi confirmado por RT-qPCR.

2.8.5. Curvas de Calibração

As concentrações de cada amostra de RNA transcrito foram determinadas a partir de diluições seriadas desde a natureza a 10^{-10} , usando o aparelho *Thermo Scientific NanoDrop 1000*, através da seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade (cópias de RNA/}\mu\text{g)} = \frac{X(\text{g}/\mu\text{L}) \text{ RNA} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{n}^\circ \text{ de nucleótidos} \times 340}$$

As rectas padrão, representando o logaritmo das concentrações (em nº de moléculas) versus o Ct para cada amostra de RNA *standard*, foram construídas através do software do termociclador (*BioRad*). O declive das curvas padrão (S) permitiu calcular a eficiência da amplificação (E) para cada concentração através da fórmula: $E = 10^{-1/S}$.

2.9. Avaliação da apoptose: Visualização do padrão de migração do DNA por electroforese em gel de agarose

Para a extração e purificação do DNA das amostras utilizou-se o *kit Apoptotic DNA Ladder (Roche)* indicado para avaliar o padrão de migração do DNA em escada, típico de células apoptóticas.

Após a infeção das células Neuro2A com os vírus em estudo, o sobrenadante das culturas foi retirado e as células lavadas 2 vezes com tampão PBS. O sedimento final contendo 2×10^6 células/mL num volume de 200 μL foi lisado com igual volume de tampão de lise. Após agitação das células, ficaram em repouso durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida adicionaram-se 100 μL de isopropanol e aplicou-se a mistura na coluna de purificação. As amostras foram centrifugadas durante 1 min a 6500 xg. O efluente foi descartado e as colunas foram lavadas 2 vezes com 500 μL de tampão de lavagem. Para proceder à eluição da amostra, o tubo colector foi substituído por um novo tubo e adicionaram-se à coluna 200 μL de tampão de eluição pré-aquecido a 70°C. Procedeu-se a nova centrifugação a 6500 xg, durante 1 min.

Os produtos das extracções (3 μg de DNA por amostra) foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TBE (89 mM Tris/HCl, 89 mM Ácido Bórico, 2 mM EDTA), com o corante GelRed a 0,01% (*Biotium*). A electroforese foi executada a 100 V (10 V/cm) durante 30 s. Os produtos foram visualizados num transiluminador de U.V.

3. Análise e Discussão de Resultados

3.1. Cinéticas de Expressão de Proteínas do Vírus da Raiva

3.1.2. Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência

A expressão da proteína N nas três estirpes estudadas é precoce comparativamente à expressão da proteína G o que está em conformidade com as fases do ciclo replicativo do vírus. Contudo, no que se refere aos aspectos qualitativos e quantitativos da fluorescência, foram registadas diferenças. Enquanto que o sinal de fluorescência para a nucleoproteína foi observado sob a forma de uma granulação muito fina e extensiva a todo o citoplasma (Fig. 4), a partir das 12 h para as estirpes fixas, no caso do vírus EBLV-1 só foi detectável às 24 h. Este resultado sugere que a expressão da proteína N do EBLV-1 é mais tardia, quando comparada com as estirpes fixas. No que diz respeito à intensidade da fluorescência, o sinal foi significativamente mais intenso nas células infectadas pelo CVS-27 quando comparada com a fluorescência observada nas células infectadas com CVS-11. Estas diferenças podem estar relacionadas com o facto da estirpe CVS-27 ter sido atenuada em cérebro de ratinho e as células utilizadas nos ensaios serem de origem murina e fenótipo neuronal, sugerindo uma melhor adaptação do CVS-27 a estas células. A mesma explicação poder-se-á aplicar ao EBLV-1, visto ser uma estirpe isolada de morcegos.

Ainda ao comparar as duas estirpes fixas, enquanto para CVS-11 a intensidade da marcação da nucleoproteína aumentou progressivamente ao longo da experiência, pelo contrário o CVS-27 atingiu o máximo da expressão às 18 h após a infecção para às 24 h registar um declínio acentuado (fluorescência focal), relacionado com o início de um novo ciclo de replicação.

Durante o ciclo replicativo do vírus da Raiva há um gradiente de transcritos, sendo que a nucleoproteína está presente ao longo de todo o ciclo, porque uma das suas funções é sinalizar o início de replicação, juntamente com a proteína L, polimerase. Ao contrário de outros vírus em que os primeiros transcritos são enzimas de síntese da molécula de DNA ou de RNA (polimerases de DNA e de RNA), no vírus da raiva há a síntese de ribonucleoproteína que, quando atinge uma concentração elevada, liga-se à molécula sintetizada pela polimerase para originar o RNA complementar intermediário da replicação, ele também associado a ribonucleoproteína como o RNA genómico. Este processo permite que em vez de transcrição ocorra a replicação.

Daqui se conclui que a estirpe fixa CVS-27 perfaz um ciclo replicativo: adsorção, entrada, expressão génica e replicação, morfogénese e gemulação de viriões recém-sintetizados em metade do tempo, utilizado pela estirpe CVS-11. É ainda de salientar que dado o processo de atenuação da estirpe CVS-11 ter ocorrido numa linha celular de fenótipo fibroblástico (BHK-21) e da estirpe CVS-27 em cérebro de ratinho, esta última pode exibir maior afinidade para células de origem neuronal, como é o caso dos neuroblastos, as células precursoras dos neurónios.

A expressão da proteína G foi detectada mais tarde e ao nível da membrana plasmática, de acordo com a sua localização na célula hospedeira e o momento de síntese, na fase final do ciclo replicativo, em todas as estirpes estudadas. Uma vez mais, as estirpes fixas exibiram diferenças de marcação entre si, com um padrão de intensidade e número de células infectadas semelhante ao anteriormente descrito, para a nucleoproteína, embora com uma diferença não tão acentuada (resultado não apresentado). A marcação da glicoproteína G do EBLV-1 foi apenas detectável às 24 h, de baixa intensidade e observada num pequeno número de células (resultado não apresentado). No seu todo, os resultados sugerem que a duração do ciclo replicativo depende da susceptibilidade e permissibilidade do sistema celular à infecção pelas diferentes estirpes de vírus da raiva.

Às 24 horas, o vírus já concluiu o primeiro ciclo replicativo e o número de células viáveis para adsorção de viriões recém-sintetizados é inferior, isto é, serão apenas as que não foram infectadas no primeiro ciclo.

A proteína N é detectada por um método de Imunofluorescência Directa e a expressão é sempre intracitoplasmática eventualmente justanuclear, visível sob a forma granular fina ou coalescente.

A Glicoproteína é detectada por um método de imunofluorescência indirecta, o qual pressupõe a utilização de dois anticorpos: um monoclonal anti-G como anticorpo primário, e um policlonal anti-espécie como anticorpo secundário. A expressão da glicoproteína é fundamentalmente membranária.

Baseados nos tempos de expressão de ambas as proteínas e na expressão intracelular ou membranária das mesmas, não nos pareceu crítica a escolha de fluorocromos diferentes. Cumpre salientar que a sensibilidade do fluorocromo Alexa e da tetra-metil-rodamina TRITC são diferentes com privilégio do primeiro.

A presença, bem como a intensidade da fluorescência a diferentes tempos de inoculação estão indicadas nas tabela 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência em células Neuro2a, 12 h p.i. **Legenda:** +++ Positivo Forte, ++ Positivo com menor nº de células infectadas, + Positivo com raras células infectadas, +- Positivo fraco, - Negativo

CVS-11 N	CVS-11 N	CVS-11 G	CVS-11 G	CVS-27 N	CVS-27 N	CVS-27 G	CVS-27 G	EBLV-1 N	EBLV-1 N	EBLV-1 G	EBLV-1 G
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-
++	++	+-	+-	+++	+++	+	+	-	-	-	-

Tabela 7 - Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência em células Neuro2a, 18 h p.i. **Legenda:** +++ Positivo Forte, ++ Positivo com menor nº de células infectadas, + Positivo com raras células infectadas, +- Positivo fraco, - Negativo

CVS-11 N	CVS-11 N	CVS-11 G	CVS-11 G	CVS-27 N	CVS-27 N	CVS-27 G	CVS-27 G	EBLV-1 N	EBLV-1 N	EBLV-1 G	EBLV-1 G
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-
+++	+++	+	+	++++	++++	++	++	-	-	-	-

Tabela 8 - Detecção das proteínas N e G por imunofluorescência em células Neuro2a, 24 h p.i. **Legenda:** +++ Positivo Forte, ++ Positivo com menor nº de células infectadas, + Positivo com raras células infectadas, +- Positivo fraco, - Negativo

CVS-11 N	CVS-11 N	CVS-11 G	CVS-11 G	CVS-27 N	CVS-27 N	CVS-27 G	CVS-27 G	EBLV-1 N	EBLV-1 N	EBLV-1 G	EBLV-1 G
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-
++++	++++	++	++	focal	focal	+	+	+	+	+-	+-

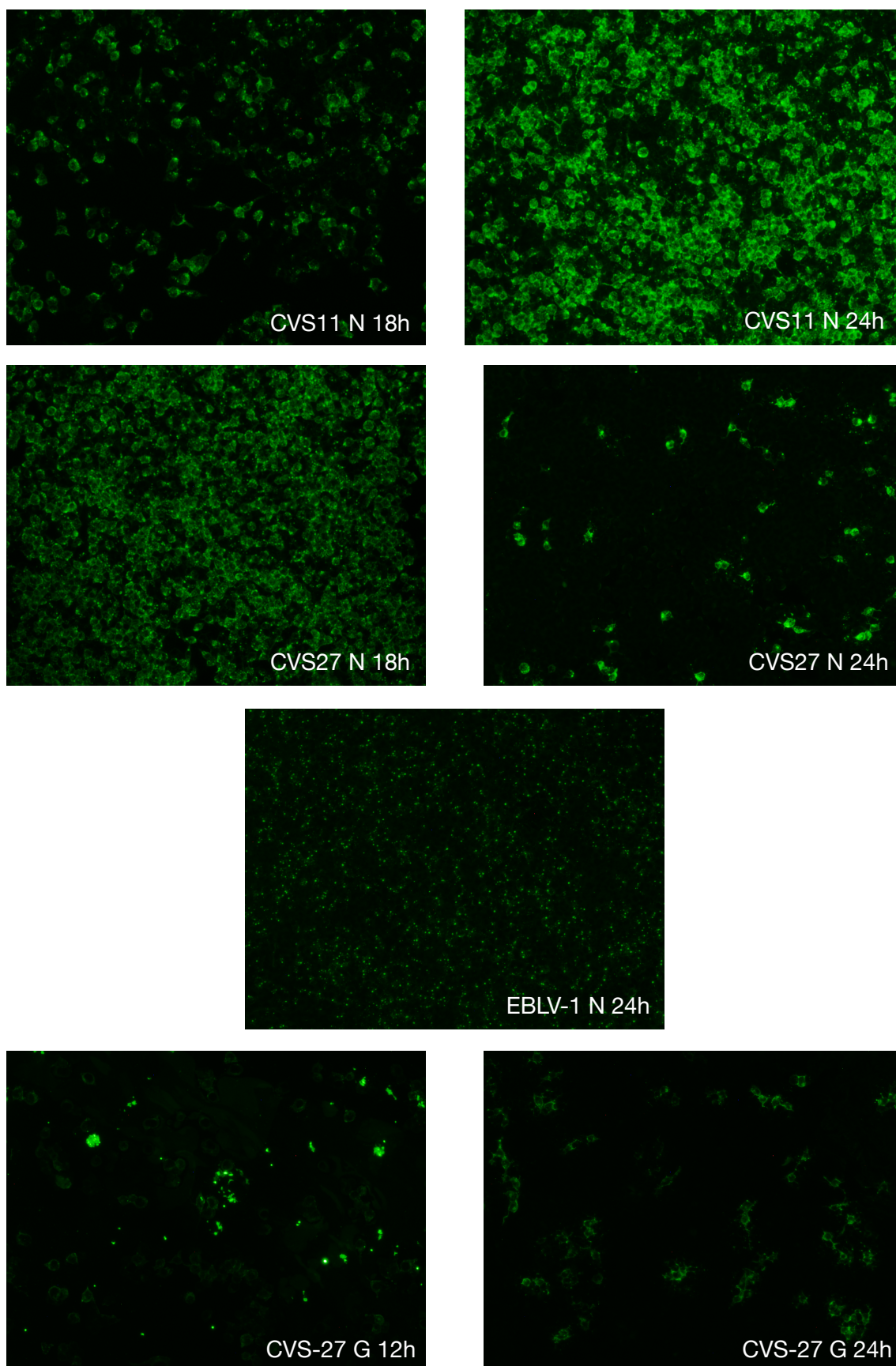


Figura 4 - Imagens de microscopia de fluorescência para detecção das proteínas N e G das estirpes em estudo. Amp. de 100x, excepto EBLV-1 N 24h - Amp. 40x.

3.1.3. Rectas de Calibração

A concentração de RNA das amostras foi determinado no *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific) e o número de cópias de RNA para cada uma das amostras foi determinado pelo software do equipamento (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração e número de cópias de RNA das amostras em estudo.

Amostra	Conc. (g/ μ L)	A260	260/280	260/230	Quantidade (Cópias de RNA/ μ L)
CVS-G	5,50E-09	0,137	2,34	0,09	2,44E+09
CVS-N	5,00E-09	0,125	2,09	0,10	2,18E+09
EBLV1-G	5,50E-09	0,136	2,44	0,06	2,43E+09
EBLV1-N	4,90E-09	0,122	2,11	0,05	2,16E+09

Para a construção da recta de calibração utilizaram-se 10 μ L de cada uma das diluições preparadas a partir das amostras na reacção RT-qPCR (Tabela 10).

Tabela 10 - Número de cópias em cada diluição utilizada para a construção das rectas de calibração.

Diluição	Número de Cópias/10 μ L			
	CVS-G	CVS-N	EBLV1-G	EBLV1-N
Natureza	2,44E+10	2,18E+10	2,43E+10	2,16E+10
-1	2,44E+09	2,18E+09	2,43E+09	2,16E+09
-2	2,44E+08	2,18E+08	2,43E+08	2,16E+08
-3	2,44E+07	2,18E+07	2,43E+07	2,16E+07
-4	2,44E+06	2,18E+06	2,43E+06	2,16E+06
-5	2,44E+05	2,18E+05	2,43E+05	2,16E+05
-6	2,44E+04	2,18E+04	2,43E+04	2,16E+04
-7	2,44E+03	2,18E+03	2,43E+03	2,16E+03
-8	2,44E+02	2,18E+02	2,43E+02	2,16E+02
-9	2,44E+01	2,18E+01	2,43E+01	2,16E+01
-10	2,44E+00	2,18E+00	2,43E+00	2,16E+00

3.1.4. RT-qPCR do gene G das estirpes fixas de CVS

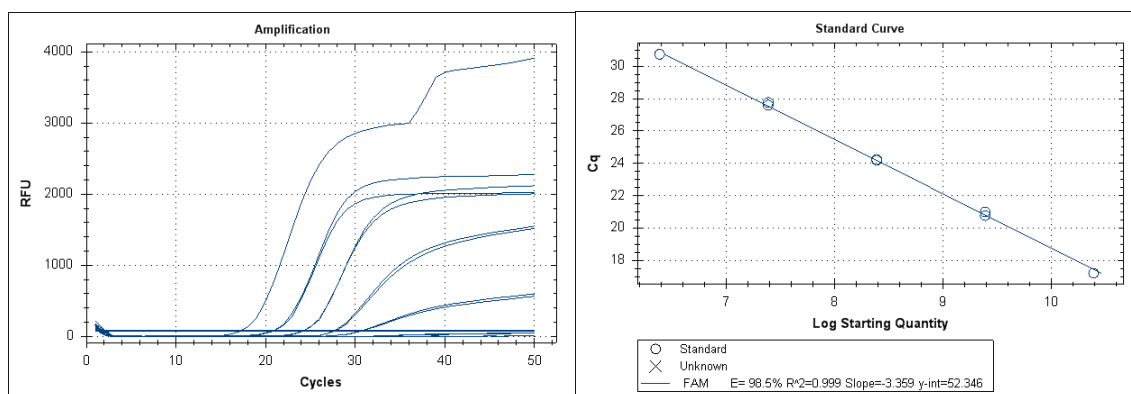


Figura 5 - Gráfico de amplificação e respectiva curva de calibração para o gene G das estirpes fixas de CVS.

Tabela 11 - Cálculo de E e R^2 relativos à recta de calibração para o gene G das estirpes fixas de CVS.

Sample	Starting Quantity	Log Starting Quantity	Ct		
CVS-G	2,44E+10	10,387	17,22		
	2,44E+09	9,387	21,01		
	2,44E+09	9,387	20,78	E=	98,50%
	2,44E+08	8,387	24,20	R²=	0,999
	2,44E+08	8,387	24,24	m=	-3,359
	2,44E+07	7,387	27,77	int. y=	52,346
	2,44E+07	7,387	27,60		
	2,44E+06	6,387	30,74		
	2,44E+06	6,387	30,74		

3.1.5 RT-qPCR do gene G da estirpe EBLV-1

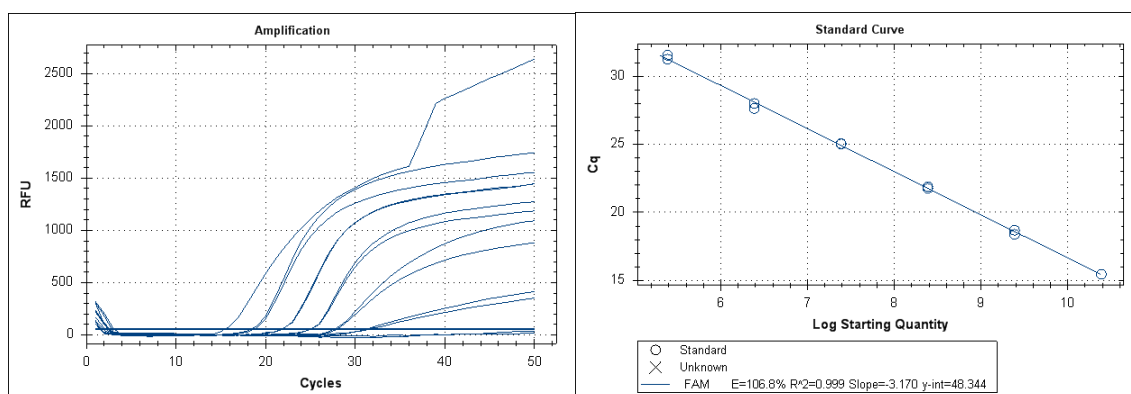


Figura 6 - Gráfico de amplificação e respectiva curva de calibração para o gene G da estirpe EBLV-1.

Tabela 12 - Cálculo de E e R² relativos à recta de calibração para o o gene G da estirpe EBLV-1.

Sample	Starting Quantity	Log Starting Quantity	Ct		
EBLV1-G	2,43E+10	10,386	15,46		
	2,43E+09	9,386	18,39		
	2,43E+09	9,386	18,69	E=	106,80%
	2,43E+08	8,386	21,77	R ² =	0,999
	2,43E+08	8,386	21,89	m=	-3,170
	2,43E+07	7,386	25,06	int. y=	48,344
	2,43E+07	7,386	25,03		
	2,43E+06	6,386	27,64		
	2,43E+06	6,386	28,01		
	2,43E+05	5,386	31,56		
	2,43E+05	5,386	31,26		

3.1.6. RT-qPCR do gene N das estirpes fixas de CVS

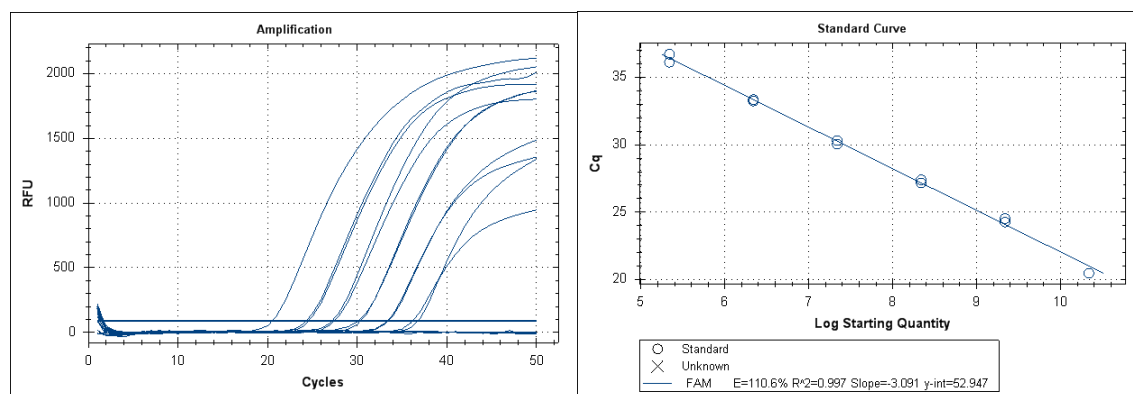


Figura 7 - Gráfico de amplificação e respectiva curva de calibração para o gene N das estirpes fixas de CVS.

Tabela 13 - Cálculo de E e R² relativos à recta de calibração para o o gene N das estirpes fixas de CVS.

Sample	Starting Quantity	Log Starting Quantity	Ct		
CVS-N	2,18E+10	10,338	20,46		
	2,18E+09	9,338	24,26		
	2,18E+09	9,338	24,52	E=	110,60%
	2,18E+08	8,338	27,40	R²=	0,997
	2,18E+08	8,338	27,16	m=	-3,091
	2,18E+07	7,338	30,31	int. y=	52,947
	2,18E+07	7,338	30,05		
	2,18E+06	6,338	33,36		
	2,18E+06	6,338	33,25		
	2,18E+05	5,338	36,73		
	2,18E+05	5,338	36,14		

3.1.7. RT-qPCR do gene N da estirpe EBLV-1

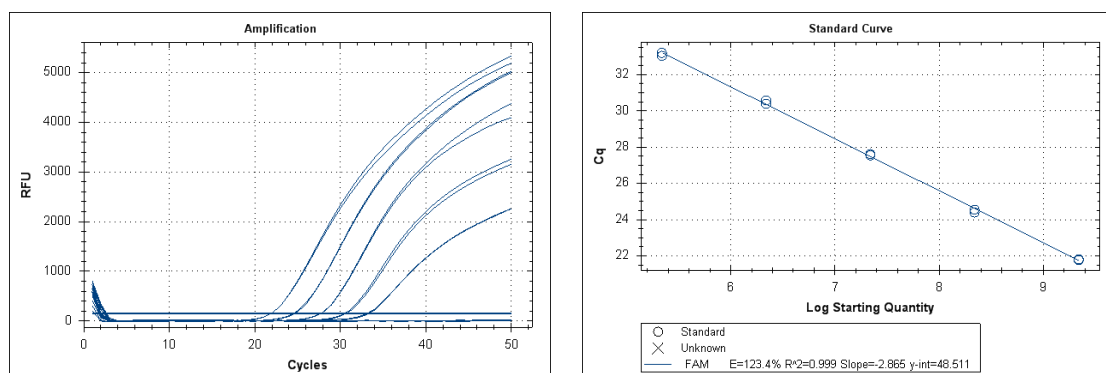


Figura 8 - Gráfico de amplificação e respectiva curva de calibração para o gene N da estirpe EBLV-1.

Tabela 14 - Cálculo de E e R² relativos à recta de calibração para o o gene N da estirpe EBLV-1.

Sample	Starting Quantity	Log Starting Quantity	Ct		
EBLV1-N	2,18E+09	9,338	21,82		
	2,18E+09	9,338	21,77		
	2,18E+08	8,338	24,40	E=	123,40%
	2,18E+08	8,338	24,55	R²=	0,999
	2,18E+07	7,338	27,55	m=	-2,865
	2,18E+07	7,338	27,62	int. y=	48,511
	2,18E+06	6,338	30,57		
	2,18E+06	6,338	30,39		
	2,18E+05	5,338	33,03		
	2,18E+05	5,338	33,20		

Da análise das rectas de calibração obtidas pode concluir-se que o valor R^2 está dentro dos parâmetros esperados em todos os ensaios efectuados com as estirpes em estudo. Os valores da eficiência de amplificação (E) estão acima do esperado para os ensaios realizados com o gene N. Este facto pode atribuir-se à formação de dímeros ou à presença de produtos não específicos que terão sido coamplificados (*mispriming*). Nas diluições mais baixas a concentração de contaminantes, poderá inibir a reacção de amplificação. Nas diluições mais altas a concentração dos inibidores é menor e não afectará tanto a eficiência que parece aumentar.

Pode também atribuir-se ao facto de não ter sido realizado o aperfeiçoamento das condições de detecção deste gene por reacção de RT-qPCR, nomeadamente no que diz respeito à concentração dos diferentes reagentes (ex. *primers* e sondas, dNTPs, concentração de Mn^{+}), tempo, e as temperaturas de emparelhamento e extensão dos *primers*.

Os gráficos das Figuras 9 e 10 apresentam as curvas de amplificação para cada estirpe e correspondentes genes G e N, respectivamente.

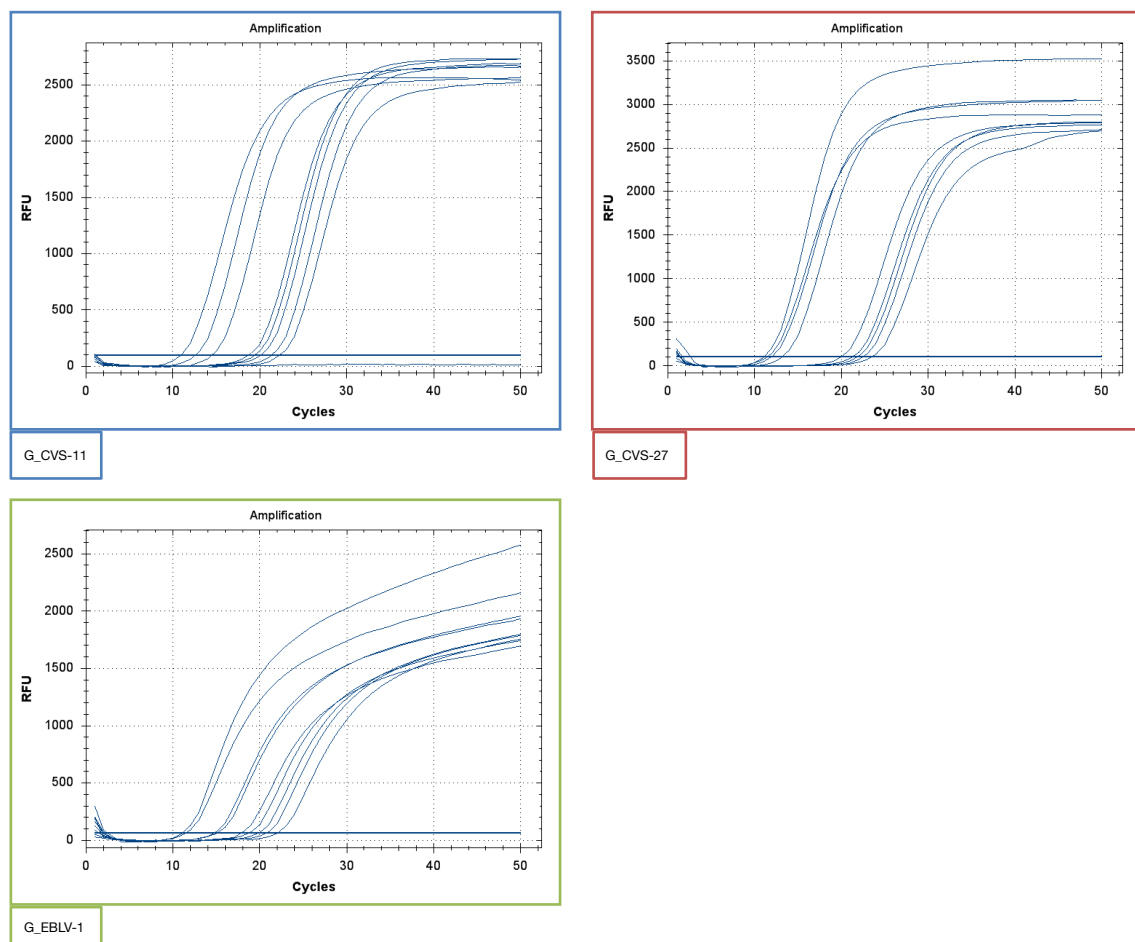


Figura 9 - Curvas de amplificação do gene G para cada uma das estirpes estudadas.

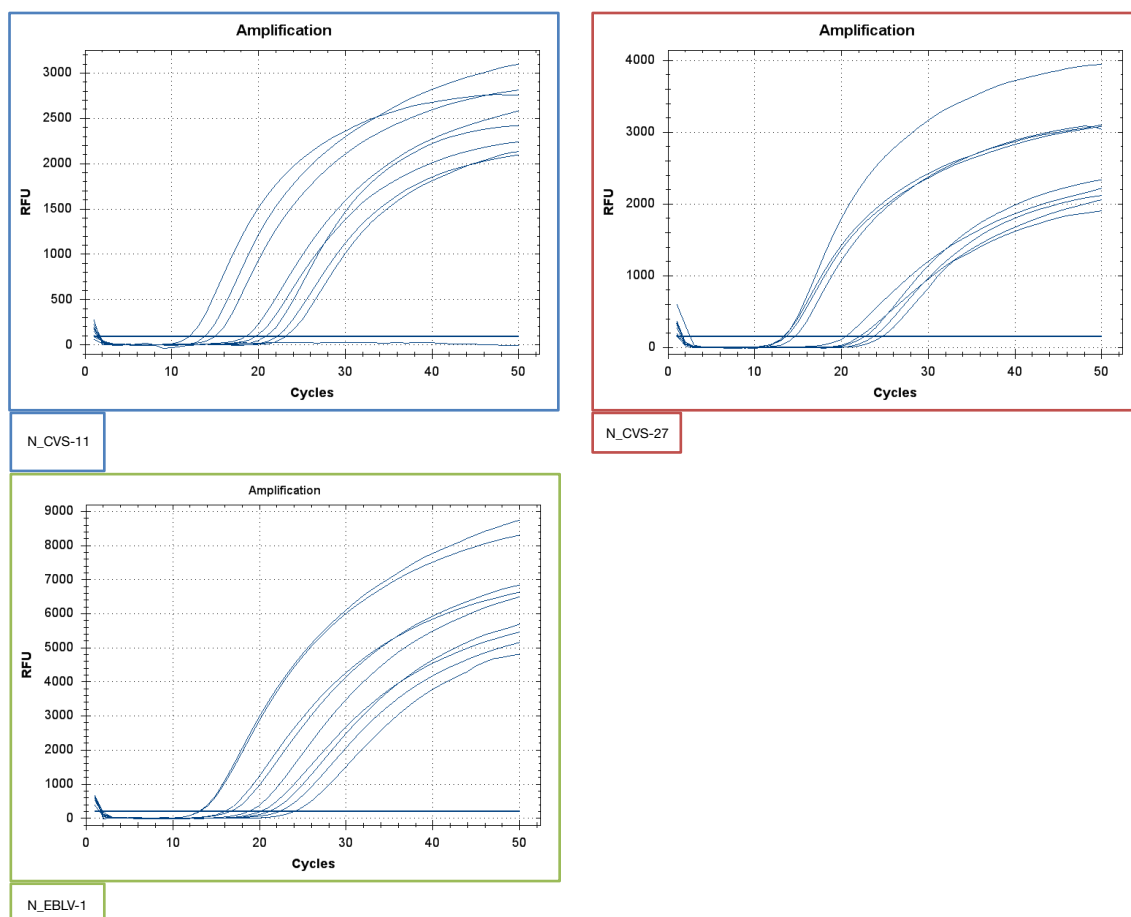


Figura 10 - Curvas de amplificação do gene N para cada uma das estirpes estudadas.

A tabela 15 representa os valores de Ct obtidos nas reacções de RT-qPCR para a Glicoproteína G, das três estirpes de vírus em estudo, assim como o número de cópias de RNA relativo a cada valor de Ct, obtidos a partir das rectas de calibração previamente construídas.

Tabela 15 - Número de cópias de RNA relativo a cada valor de Ct obtido nas reacções de RT-qPCR para a glicoproteína G.

G	CVS-11		CVS-27		EBLV-1	
	Ct	Nº Cópias	Ct	Nº Cópias	Ct	Nº Cópias
0	22,24	9,20E+08	23,45	4,00E+08	22,00	2,04E+08
2	21,31	1,73E+09	22,44	7,98E+08	20,69	5,29E+08
4	20,10	3,99E+09	21,81	1,23E+09	19,76	1,04E+09
6	19,40	6,42E+09	21,25	1,81E+09	18,66	2,32E+09
8	18,64	1,08E+10	20,00	4,28E+09	17,83	4,22E+09
12	14,47	1,89E+11	13,16	4,64E+11	14,68	4,15E+10
18	12,57	6,94E+11	11,40	1,54E+12	15,07	3,14E+10
24	10,94	2,13E+12	11,93	1,08E+12	11,40	4,51E+11
48			11,07	1,94E+12	11,07	5,75E+11

Da análise dos resultados obtidos, é possível concluir que o número de cópias aumenta significativamente entre as 8 h e 12 h p.i. para as estirpes fixas CVS-11 e CVS-27, com a consequente diluição dos valores de Ct, que para CVS-11 baixam de Ct:18,64 para Ct: 14,47 (4,17) e no CVS-27 de Ct:20,00 para Ct:13,16 (6,84). Este fenómeno vai de encontro ao descrito como sendo o período de eclipse do vírus, espaço temporal que medeia entre a descapsidação e o início da morfogénese de novas partículas infecciosas. Para a estirpe EBLV-1, o aumento do número de cópias de RNA e a diminuição dos valores de Ct é mais lento e evolui de forma gradual ao longo de todo o ensaio, quando comparada com as outras estirpes.

Pela análise das curvas de amplificação do gene G das estirpes de CVS-11 e CVS-27, verifica-se que, após a fase exponencial de amplificação, ocorre uma fase estacionária, sinal de que houve o esgotamento dos reagentes da reacção RT-qPCR (ex.: *primers*, sonda, enzima). Esta fase não é observada com a estirpe EBLV-1, sugerindo que o número de cópias obtidas durante os ciclos de amplificação não foram suficientes para esgotar os reagentes.

O gráfico da Figura 11 resume a cinética de transcrição do gene G para as estirpes em estudo.

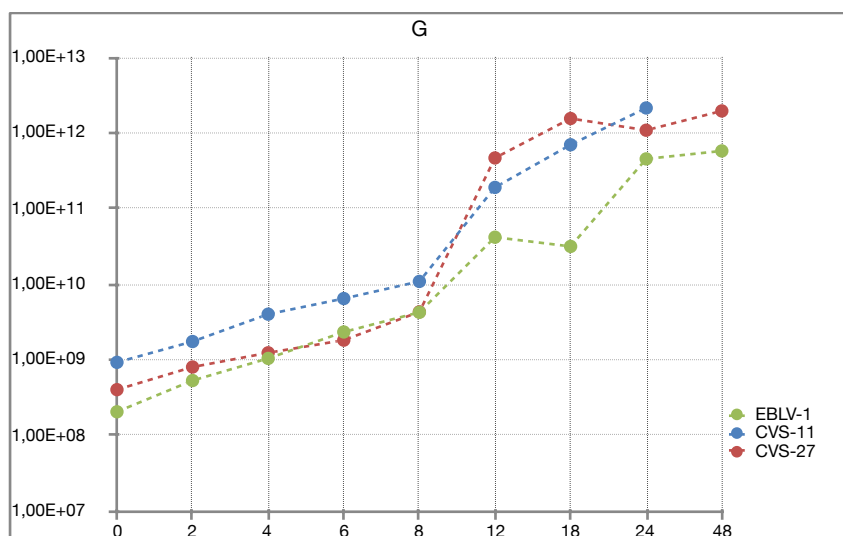


Figura 11 - Cinética de transcrição do gene G para as estirpes em estudo.

Esta análise evidencia uma evolução mais lenta e gradual de EBLV-1 quando comparada com as estirpes fixas. Este resultado poderá estar relacionado com a fraca adaptação desta estirpe às condições do ensaio. As estirpes isoladas em morcegos, nomeadamente a que está em causa, possuem maior aptidão de crescimento em células de fenótipo não neuronal, como as BHK-21, e a temperaturas inferiores a 37°C, o que derivará do facto de os morcegos terem uma temperatura corporal inferior à de outras espécies animais. Da nossa experiência, confirmada pelo laboratório de referência da OIE para a raiva, as estirpes europeias de Lyssavírus de morcegos (EBLV-1 e EBLV-2) multiplicam e atingem títulos mais elevados quando se utilizam células do tipo fibroblasto (BHK21). Este facto poderá sugerir que as células Neuro2a serão menos susceptíveis e permissivas à infecção pelos Lyssavírus do genótipo 5 (EBLV-1).

Da análise dos resultados obtidos nas reacções de RT-qPCR para o gene N, verificou-se que o incremento do número de cópias de RNA não foi tão expressivo quanto o observado no ensaio relativo ao gene G. Isto pode ser explicado pelo facto dos transcritos do gene N estarem presentes ao longo de todo o ciclo replicativo, dada a sua função de sinalizar o início da replicação. Contudo, a observação de que a evolução do número de cópias de N na cinética de EBLV-1 é lenta e gradual ao longo de todo o tempo do ensaio explica-se pelas mesmas razões acima referidas.

A tabela 16 representa os valores de Ct obtidos nas reacções de RT-qPCR para a Nucleoproteína N, assim como o número de cópias de RNA relativo a cada valor de Ct, obtidos a partir das rectas de calibração previamente calculadas.

Tabela 16 - Número de cópias de RNA relativo a cada valor de Ct obtido nas reacções de RT-qPCR para a glicoproteína N.

a glicosproteína N.						
N	CVS-11		CVS-27		EBLV-1	
Tempo (h)	Ct	Nº Cópias	Ct	Nº Cópias	Ct	Nº Cópias
0	23,18	4,26E+09	24,74	1,34E+09	24,03	3,51E+08
2	22,19	8,91E+09	23,75	2,79E+09	22,24	1,47E+09
4	20,88	2,38E+10	22,77	5,80E+09	21,09	3,73E+09
6	19,72	5,63E+10	22,10	9,57E+09	20,09	8,32E+09
8	18,57	1,33E+11	20,50	3,15E+10	18,68	2,57E+10
12	15,05	1,82E+12	14,64	2,48E+12	15,95	2,33E+11
18	13,84	4,49E+12	13,35	6,48E+12	16,55	1,43E+11
24	12,06	1,68E+13	13,62	5,27E+12	13,09	2,31E+12
48			13,42	6,15E+12	13,01	2,46E+12

O gráfico da Figura 12 resume a cinética de transcrição do gene N para as estirpes em estudo.

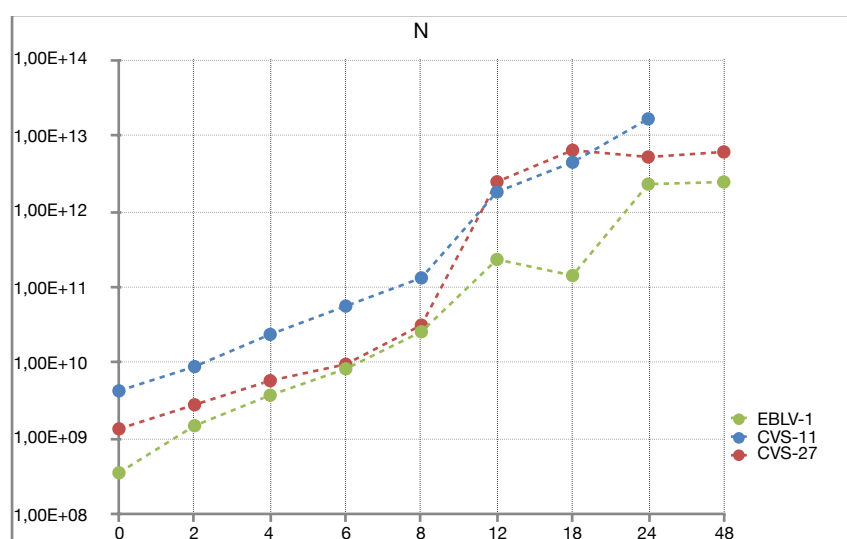


Figura 12 - Cinética de transcrição do gene N para as estirpes em estudo.

O gráfico da Figura 12 resume e consolida as considerações anteriormente apontadas - os incrementos de número de cópias de RNA não são tão evidentes como no ensaio paralelo para a Glicoproteína para as estirpes CVS-11 e CVS-27, e a evolução lenta e gradual para o EBLV-1.

3.2. Apoptose

As imagens apresentadas nas Figuras 13 e 14 demonstram os resultados da análise do padrão de migração do DNA em escada, típico de células apoptóticas, das diferentes estirpes de Lyssavírus em estudo.

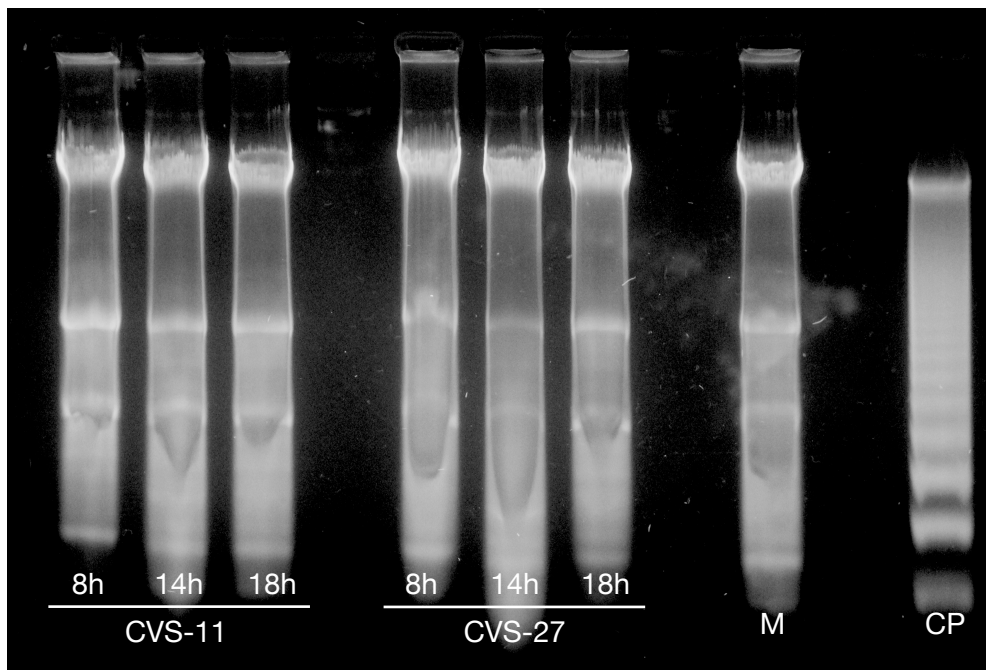


Figura 13 - Visualização do padrão de migração em electroforese do DNA extraído de culturas de células Neuro2a a diferentes tempos após infecção. M - células não inoculadas, CP - Controlo Positivo.

Os resultados obtidos não permitem concluir a existência de fragmentação do DNA celular em tempo precoce de infecção. Segundo Zan *et al.* e Gholami *et al.*, o efeito apoptótico do vírus é apenas detectável a partir das 72 h após a infecção, atingindo o máximo às 96 h p. i., mesmo para estirpes apatogénicas pro-apoptóticas ERA e SAD Bern 19.

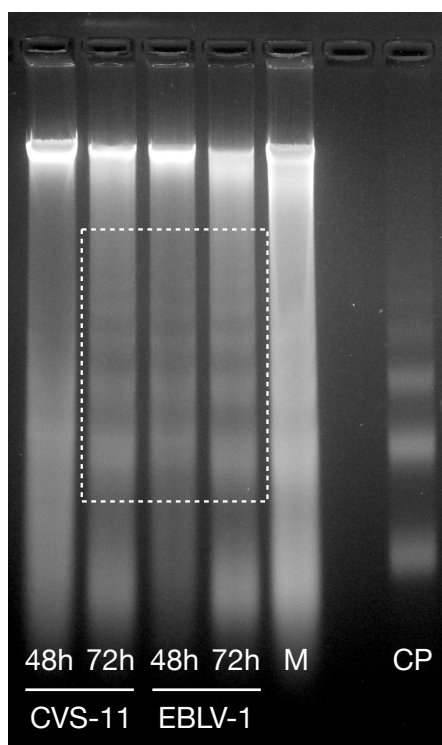


Figura 14 - Visualização do padrão de migração em electroforese do DNA extraído de culturas de células Neuro2a às 48h e 72h após infecção. Efeito de escada, típico de apoptose marcado pelo rectângulo a tracejado. M - células não inoculadas, CP - Controlo Positivo.

A apoptose pode ser induzida por via extrínseca, pela activação da cascata das caspases, ou por via intrínseca mitocondrial. Na infecção pelo vírus da raiva a apoptose é induzida por esta última via. [Zan *et al.*, 2016; Gholami *et al.*, 2008]

Os resultados dos ensaios preliminares realizados às 48 h e 72 h após a infecção, sugerem que, tanto a estirpe CVS-11 quanto a estirpe EBLV-1, evidenciam sinais de fragmentação do DNA celular. Surpreendentemente, a apoptose das células infectadas pelo EBLV-1 é detectada às 48 h p.i. Este fenómeno está em contradição com o número de cópias detectadas para o gene G por RT-qPCR, uma vez que, de acordo com Morimoto *et al.* (1999), as estirpes mais apoptóticas expressam mais proteína G. Este resultado terá de ser alvo de mais estudos e complementado com a detecção da anexina e outros indicadores da morte celular programada.

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a influência da glicoproteína G do vírus da raiva na replicação *in vitro* e na indução de apoptose da célula hospedeira.

Desta forma, foram comparados dois genótipos distintos - genótipo 1 (estirpes CVS-11 e CVS-27) e genótipo 5 (EBLV-1) - avaliando a cinética de replicação por RT-qPCR e através da expressão da Nucleoproteína, uma proteína intimamente associada à molécula de RNA, e da Glicoproteína G, uma proteína de envólucro cuja tradução no retículo endoplasmático (RE) e posterior glicosilação no Aparelho de Golgi, justifica a expressão temporal da mesma no ciclo replicativo, por imunofluorescência.

O estudo da cinética da expressão da proteína N nas três estirpes estudadas sugere que a sua expressão é precoce comparativamente à expressão da proteína G, facto que vai de encontro ao nível de expressão destas proteínas durante o ciclo replicativo do vírus.

No que diz respeito à intensidade de fluorescência e ao número de células infectadas, as estirpes fixas exibiram diferenças de marcação entre si, tendo a estirpe CVS-27 um padrão de intensidade e número de células infectadas superior à estirpe CVS-11.

A marcação da glicoproteína G e da nucleoproteína N do EBLV-1 foi apenas detectável às 24 h p.i., com baixa intensidade e observada num pequeno número de células, resultado que sugere que a estirpe EBLV-1 tenha um ciclo replicativo mais lento, quando comparada com as estirpes fixas.

Em conclusão, os ensaios efectuados sugerem que a duração do ciclo replicativo depende da susceptibilidade e permissibilidade do sistema celular à infecção pelas diferentes estirpes de vírus da raiva.

A apoptose foi avaliada através das alterações do DNA celular. Pelos resultados obtidos não é possível concluir a existência de fragmentação do DNA celular em tempo precoce de infecção para as estirpes fixas CVS. Contudo, os resultados obtidos a partir dos ensaios preliminares realizados às 48 h e 72 h após a infecção, que compararam a estirpe CVS-11 com a estirpe EBLV-1, revelaram-se interessantes uma vez que evidenciaram sinais de apoptose em ambas as estirpes, nomeadamente o efeito de escada que é visivelmente mais intenso nos dois tempos testados para a estirpe EBLV-1. Estes resultados abrem a possibilidade para mais estudos comparativos, que envolvam outras técnicas, tanto de apoptose precoce ou tardia, sejam eles a detecção da anexina, técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling assay*) ou outros indicadores da morte celular programada.

5. Referências Bibliográficas

- Badrane, H. et al. (2001). "Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity." *J Virol* 75(7): 3268-3276.
- Badrane, H. et al. Tordo (2001). "Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders." *J Virol* 75(17): 8096-8104.
- Barecha, C.B. et al. (2017). "Epidemiology and Public Health Significance of Rabies." *Perspectives Med Res* 5(6): 55-67.
- Begeman, L. et al. (2018). "Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans." *Lancet Infect Dis.* 18(4): e147-e159.
- Botvinkin, A.D. et al. (2003). "Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia." *Emerg Infect Dis* 9(12): 1623-1625.
- Brookes, S.M. et al. (2005). "Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses." *Vaccine* 23(32): 4101-4109.
- Davis, P.L. et al. (2006). "The evolutionary history and dynamics of bat rabies virus." *Infect, Genet Evol* 6(6): 464-473.
- Dietzschold, B. et al. (2008). "Concepts in the pathogenesis of rabies." *Future Virol* 3(5): 481-490.
- Finke, S. et al. (2005). "Replication strategies of rabies virus." *Virus Res* 111(2): 120-131.
- Flint, J. et al. (2015). *Principles of Virology* 4thEd. ASM Press.
- Fooks, A.R. et al. (2009). "Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century." *PLoS Negl Trop Dis* 3(9): e530.
- Franka, R. et al. (2006). "A new phylogenetic lineage of Rabies virus associated with pipistrelle bats (*Pipistrellus hesperus*)." *J Gen Virol* 87: 2309-2321.
- Fu, Z.F. et al. (1993). "Differential effects of rabies and borna disease viruses on immediate-early- and late-response gene expression in brain tissues." *J Virol* 67(11): 6674-6681.
- Gholami, A. et al. (2008). "Mitochondrial dysfunction in lyssavirus-induced apoptosis." *J Virol* 82(10): 4774-4784.
- Hanlon, C.A. et al. (2001). "Experimental utility of rabies virus-neutralizing human monoclonal antibodies in post-exposure prophylaxis." *Vaccine* 19(28-29): 3834-3842.
- Hanlon, C.A., et al. (2001). "The incurable wound revisited: progress in human rabies prevention?" *Vaccine* 19(17-19): 2273-2279.
- Hayman, D.T. et al. (2008). "Antibodies against Lagos bat virus in megachiroptera from West Africa." *Emerg Infect Dis* 14(6): 926-928.

- Heaton, P.R. et al. (1997). "Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses." *J Clin Microbiol* 35(11): 2762-2766.
- Heaton, P.R. et al. (1999). "Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR." *J Virol Methods* 81(1-2): 63-69.
- Jackson, A.C. et al. (1997). "Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection." *J Virol* 71(7): 5603-5607.
- Jackson, A.C. et al. (2006). "Comparative pathogenesis of recombinant rabies vaccine strain SAD-L16 and SAD-D29 with replacement of Arg333 in the glycoprotein after peripheral inoculation of neonatal mice: less neurovirulent strain is a stronger inducer of neuronal apoptosis." *Acta Neuropathol*, 111: 372-378.
- Kono, H. et al. (2008). "How dying cells alert the immune system to danger." *Nat Rev Immunol* 8(4): 279-289.
- Kuzmin, I.V. et al. (2010). "Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus." *Virus Res* 149(2): 197-210.
- Markotter, W. et al. (2008). "Phylogeny of Lagos bat virus: challenges for lyssavirus taxonomy." *Virus Res* 135(1): 10-21.
- Marston, D.A. et al. (2012). "Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. *Emerg Infect Dis* 18(4): 664-667.
- McCall, B.J. et al. (2000). "Potential exposure to Australian bat lyssavirus, Queensland, 1996-1999." *Emerg Infect Dis* 6(3): 259-264.
- Morimoto, K., et al. (1999). "Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures." *J Virol* 73(1): 510-518.
- Murphy, F.A. et al. (1999). *Veterinary Virology*. Academic Press.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2019) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial Animals - Rabies (Infection with Rabies Virus and Other Lyssaviruses*. Chapter 3.1.17: 578-612.
- Pulmanausahakul, R. et al. (2008). "The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread." *J Virol* 82(5): 2330-2338.
- Tao, L. et al. (2010). "Molecular Basis of Neurovirulence of Flury Rabies Virus Vaccine Strains: Importance of the Polymerase and the Glycoprotein R333Q Mutation." *J Virol* 84(17): 8926-8936.
- Thoulouze, M.I. et al. (1998). "The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus." *J Virol* 72(9): 7181-7190.
- Ting, J.P., et al. (2008). "NLRs at the intersection of cell death and immunity." *Nat Rev Immunol* 8(5): 372-379.
- Tuffereau, C. et al. (1998). "Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus." *EMBO J* 17(24): 7250-7259.

Tuffereau, C. et al. (1998). "Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells." *J Virol* 72(2): 1085-1091.

Vázquez-Móron, S. et al. (2011). "Phylogeny of European bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* bats, Spain." *Emerg Infect Dis* 17(3): 520–523.

Warrell, M.J. et al. (2004). Rabies and other Lyssavirus. *The Lancet* 363: 959-969.

Zan, J., et al. (2016). "Rabies virus matrix protein induces apoptosis by targeting mitochondria." *Exp Cell Res* 347(1): 83-94.